

Universitat Autònoma de Barcelona
Departamento de Obstetricia Ginecología, Pediatría y Salud Pública
Cátedra de Obstetricia y Ginecología
Unidad Docente Vall d'Hebron
Prof. Dr. Luís Cabero i Roura.

Amniocentesis precoz con amniofiltración como método diagnóstico prenatal temprano comparado con biopsia corial y amniocentesis precoz sin amniofiltración.

Trabajo presentado por el Licenciado en Medicina
Abel Guzmán López
Como tesis dentro del programa de Doctorado

Directores.
Prof. Dr. Luís Cabero i Roura. Universitat Autònoma de Barcelona (España)
Dr. Med. Santos Guzmán López. Universidad Autónoma de Nuevo León (México)

A mis padres, esposa e hijos

A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero manifestar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado con sus conocimientos y buen hacer docente en la realización de este trabajo:

Al Profesor Luís Cabero i Roura, catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio del Hospital Materno-infantil Vall d' Hebrón. Porque sin su orientación inicial y acogida en su Servicio nunca se hubiera realizado este trabajo.

Al Dr.med. Santos Guzmán López, Jefe del Departamento de Anatomía y profesor del Departamento de Anatomía de la Carrera de Médico Cirujano y Partero de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. por su capacidad crítica y reflexiva

Al Dr. Donato Saldívar Rodríguez, profesor de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (México) Jefe del Departamento del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital José E. González de Monterrey, México por su incondicional apoyo hizo posible mi estancia en Barcelona y también por su ayuda a lo largo de la realización de este trabajo.

A La Dra. Inmaculada Farrán Codina, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Universidad Autónoma de Barcelona, por su dirección, apoyo incondicional, comprensión y paciencia para la realización de esta tesis, pero sobre todo gracias por su amistad, que es lo más valioso que he encontrado en Barcelona

Al Dr.med. Norberto Serna López, profesor del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UANL, México por sus sabios consejos en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Ángeles Sánchez Durán, Médico adjunto de la Unidad de Diagnóstico Prenatal del Hospital Vall d' Hebrón por su capacidad docente, rigor en la enseñanza de los métodos invasivos y observaciones durante la realización de este trabajo.

A los doctores Carmen Mediano y Alberto Plaja, Biólogos Citogenetistas de la Unidad de Genética del Hospital Vall d'Hebron por sus enseñanzas en el campo de la citogenética, su ayuda en la selección bibliográfica y su paciencia.

A la Señora Catalina Ruiz Altisent, Comadrona de la Unidad de Diagnóstico Prenatal del Hospital Vall d'Hebrón por su tolerancia a la inexperiencia inicial de todos los médicos extranjeros que se incorporan a la unidad, decidido apoyo, sugerencias y críticas.

Al Lic. Físico-Matemático Juan Manuel Russildi Garza, Coordinador del Área de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la UANL, por su gran ayuda en el análisis estadístico de la presente.

Al Dr. Sci. Agr Geraldina Guerrero González, Investigadora del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su gran ayuda en la edición de esta tesis.

Al Dr. Iván Hernández León, Médico residente del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León por la edición e impresión de esta tesis.

A los médicos residentes del Hospital Vall d' Hebrón de la Universidad Autónoma de Barcelona por su apoyo en la elaboración de esta tesis doctoral.

T a b l a d e C o n t e n i d o

I.- Embriología	15
I.1.- Embriología del amnios y de la cavidad amniótica	15
II.- Líquido amniótico	18
II.1.- Líquido amniótico	18
II.2.- Composición del líquido amniótico	18
III. Tamizaje y diagnóstico prenatal	23
III.1. Introducción	23
III.2. Asesoramiento preconcepcional	25
III.3. Tamizaje bioquímico materno	26
III.4. Ultrasonografía	28
III.5. Pruebas diagnósticas invasivas	31
III.5.1. Indicaciones	38
III.6. Amniocentesis clásica	39
III.7. Amniocentesis transplacentaria	41
III.8. Complicaciones	41
III.9. Amniocentesis temprana o precoz	45
III.9.1 Amniocitos en amniocentesis precoz	48
III.10. Malformaciones congénitas o disfunciones anatómicas tras la amniocentesis temprana y Biopsia de vellosidades coriales.	51
III.11. Amniotiltración en amniocentesis temprana	57

III.11.1 Semanas de gestación para amniocentesis	61
III.11.2 Cantidad de líquido amniótico	61
III.11.3 Cantidad y tipo celular	61
III.12. Biopsia de vellosidades coriales	62
III.12.1. Indicaciones	66
III.12.2. Interpretación de los resultados	67
III.12.3. Semanas de gestación en que se realiza la BVC	70
III.13. Cordocentesis	71
III.14. Biopsia fetal	72
III.15. Diagnóstico citogenético	73
IV. Mosaicismo placentario	75
V. Estudio citogenético del líquido amniótico	78
VI. Justificación	81
VII. Planteamiento del problema	85
VII.1. Hipótesis	86
VII.2. Objetivos generales y específicos	87
VII.2.1. Objetivo general	87
VII.2.2. Objetivos específicos	87
VIII. Material y métodos	88
VIII.1. Población muestra	89
VIII.2. Criterios de inclusión	90

VIII.3. Criterios de exclusión	88
VIII.4. Consentimiento informado	89
VIII.5. Procedimiento de la amniocentesis precoz	90
VIII.6. Procedimiento de la BVC transabdominal	92
VIII.7. Procedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración	94
VIII.8. Procesamiento de la muestra	98
VII.8.1. Seguimiento postpunción	99
VIII.9. Revisión y procesamiento de datos	99
IX. Resultados	101
IX.1. Fallas en el cultivo	102
IX.2. Complicaciones de los procedimientos	103
IX.2.1. Complicación intraprocedimiento de la AP	103
IX.2.2. Complicaciones intraprocedimiento de la AP con amniofiltración	104
IX. 2.3. Complicaciones intraprocedimiento de la BVC	105
IX.2.4. Complicaciones postprocedimiento de la AP	105
IX.2.5. Complicaciones postprocedimiento de la AP con amniofiltración.	106
IX.2.6. Complicaciones postprocedimiento de la BVC	107
X. Discusión	109
XI. Conclusiones	115
XII. Referencias bibliográficas	118

G l o s a r i o

Aborto espontáneo: Es la expulsión del producto de la concepción (antes de las 20 semanas) sin intervención mecánica o farmacológica (Wilson RD, 1995, Johnson JM, 1999).

Aborto imputable al procedimiento: Es el que tiene lugar en las dos semanas subsiguientes al procedimiento y en el que el producto no muestra malformación o anomalía cromosómica (Wilson RD, 1995).

Aborto inducido o terapéutico: Es la terminación precoz de la gestación (antes de las 20 semanas) mediante métodos mecánicos o farmacológicos (Wilson RD, 1995).

Amniocentesis clásica: La que se efectúa entre la semana 15-17 de gestación (Emery EAH, 1970), o incluso hasta la semana 19 (Wilson RD, 1995) ó 91-126 días post ovulación.

Amniocentesis guiada mediante ecografía: Es la realizada con la concurrencia de la ecografía en tiempo real para guiar todo el procedimiento incluyendo la introducción de la aguja, la aspiración del líquido y la remoción de la aguja. Pueden usarse tanto la técnica de "manos libres", como con la guía adosada al transductor para dirigir la aguja. El control mediante ecografía permite evaluar la presencia de hemorragia intraamniótica materna, hematomas retroplacentarios o retroamnióticos, así como extravasación de líquido (Wilson RD, 1995).

Amniocentesis temprana: La que se efectúa entre la semana 10 a 14 de edad gestacional (Emery EAH, 1970; Henry GP, 1992) o 63-90 días postovulación (Wilson RD, 1995)

Amniocentesis: Extracción de líquido del saco amniótico mediante aspiración a través de una aguja generalmente insertada a través de la pared abdominal (Sundberg K, 1990b). Pueden distinguirse dos variantes según el tipo de punción: transplacentaria y extraplacentaria (Wilson RD, 1995).

Biopsia de vellosidades coriales: Método alternativo para el diagnóstico citogenético donde se extraen vellosidades coriales de la placenta para su estudio (Sundberg K, 1995b).

Biopsia fetal: Extracción de tejido fetal mediante pinza de biopsia o aspiración por aguja (Ralston SJ, 2004).

Cariotipo fetal: Estudio de los cromosomas para identificar anomalía o alteraciones estructurales o numéricas (Ralston SJ, 2004).

Cordocentesis: Extracción de sangre fetal del cordón umbilical mediante aspiración a través de una aguja generalmente insertada a través de la pared abdominal (Ralston SJ, 2004).

Cromosomas: Estructuras que están localizadas dentro de cada célula del cuerpo y contienen los genes que determinan el fenotipo de los seres vivos (Ralston SJ, 2004).

Ecografía: Es un examen en el cual se utilizan las ondas sonoras para examinar estructuras internas, durante el embarazo. Puede ser utilizado para examinar al feto (Germain A, 1992).

Líquido amniótico: Líquido contenido alrededor del feto en el saco gestacional (Germain A, 1992).

Pérdida gestacional total: Incluye los abortos espontáneos antes o después de un procedimiento de diagnóstico prenatal, abortos terapéuticos, muerte intrauterina después de las 20 semanas de gestación y muerte neonatal durante los primeros 28 días de vida (Ralston SJ, 2004).

Pseudomosaicismo: Corresponde a una alteración que se presenta en los amniocitos en cultivo, es un evento *in vitro* y no refleja las características del feto (Milunsky A, 1998; Hsu L, 1992).

Vellosidad corial: Componente microscópico estructural de la placenta (Ralston SJ, 2004).

N o m e n c l a t u r a

Abreviación	Significado
AFP	Alfa feto proteína
AC	Amniocentesis clásica
AP	Amniocentesis precoz
AT	Amniocentesis temprana
B-hGC	Fracción beta de la hormona gonadotrópica humana.
BF	Biopsia fetal
BVC	Biopsia corial
DCTN	Defectos del tubo neural
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Diagnóstico prenatal
EG	Edad gestacional
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
hGC	Hormona gonadotrófica humana
IC	Intervalo de confianza
ILA	Índice de líquido amniótico
INH-A	Inhibina A
LA	líquido amniótico
MCP	Mosaicismo confinado a placenta
PAPP-A	Proteína plasmática asociada al embarazo
TMS	Triple marcador sérico
QF-PCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente
TN	Traslucencia nucal

R e s u m e n

Las pruebas de tamizaje prenatal comprenden el asesoramiento preconcepcional, tamizaje materno bioquímico y la ultrasonografía, además de pruebas diagnósticas invasivas como amniocentesis clásica, temprana y con técnica de filtración, la biopsia de vellosidades coriales, biopsia fetal y cordocentesis.

El objetivo principal de este estudio fue analizar comparativamente el método de amniofiltración, sus ventajas e inconvenientes en relación con los métodos existentes como la biopsia corial y la amniocentesis precoz sin amniofiltración. Analizando el tiempo necesario para realizar cada procedimiento, los fallos en el cultivo, así como las complicaciones intraprocedimiento y postprocedimiento de cada técnica.

En el estudio participaron 921 mujeres candidatas a cariotipo fetal. A 310 pacientes se les realizó biopsia corial, a 302 pacientes amniocentesis precoz con amniofiltración y a 309 pacientes amniocentesis precoz convencional sin amniofiltración. La biopsia corial se realizó a las 11.09 semanas, la amniocentesis precoz con amniofiltración a las 12.48 semanas y la amniocentesis precoz sin amniofiltración a las 12.98 semanas en promedio.

Comparativamente, la amniocentesis precoz con amniofiltración requirió mayor tiempo de realización en relación a las otras dos técnicas. De los 921 casos, solo en un 3.4 % se presentaron

complicaciones clasificadas como leves moderadas y graves; 9 de ellas en el procedimiento de biopsia corial, 12 durante el procedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración y 11 durante y post procedimiento de amniocentesis precoz sin amniofiltración.

Se presentaron 6 casos de fallo de cultivo para cariotipo en la biopsia corial, 2 en la amniocentesis precoz con amniofiltración y 3 en amniocentesis precoz sin amniofiltración.

A partir de estos resultados se puede concluir que el método de diagnóstico prenatal amniocentesis precoz con amniofiltración no conlleva ventaja sobre las técnicas de amniocentesis precoz sin amniofiltración y la biopsia corial y que la mayoría de los autores concuerdan en que existen mayores complicaciones cuando estas técnicas se realizan a menor edad gestacional.

No existen estudios randomizados para la amniocentesis entre las semanas 13-15 que demuestren claramente la efectividad de la amniocentesis temprana y amniofiltración, por lo que no se debe de considerar como un procedimiento seguro en comparación con la amniocentesis clásica y biopsia de vellosidades coriales, además que en la actualidad existen técnicas como la hibridación in situ con inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente, que brindan un diagnóstico citogenético más rápido y seguro de la mayoría de las anomalías cromosómicas.

S u m m a r y

The prenatal screening tests consist of assessment before conception, maternal biochemical screening and a sonogram, in addition to invasive diagnostic tests such as the classical early amniocentesis with a filtration technique, a biopsy of the chorionic villi, a fetal biopsy and chordocentesis.

The main objective of this study was to comparatively analyze the amniofiltration method, its advantages and disadvantages in relation to existing methods such as the chorionic biopsy and early amniocentesis without amniofiltration. The time necessary to carry out each procedure was analyzed as well as the problems with the culture and all of the intraprocedural and post-procedural complications of each technique.

921 women fetal karyotype candidates participated in the study. A chorionic biopsy was carried out on 310 patients, 302 patients had early amniocentesis with amniofiltration and 309 patients had conventional early amniocentesis without amniofiltration. On the average, chorionic biopsies were performed at 11.09 weeks, early amniocentesis with amniofiltration was performed at 12.48 weeks and early amniocentesis without amniofiltration was performed at 12.98 weeks.

Comparatively, the early amniocentesis with amniofiltration required more time to be performed when compared to the other two techniques. Of the 921 cases, only 3.4% had complications classified as slightly moderate to serious, 9 of them occurred with the chorionic biopsy procedure, 12 during the early amniocentesis with amniofiltration procedure and 11 during and after the early amniocentesis without amniofiltration procedure.

6 cases of karyotype failures of the cultures occurred with the chorionic biopsy, 2 with the early amniocentesis with amniofiltration and 3 with early amniocentesis without amniofiltration.

From these results, it can be concluded that the prenatal diagnostic method of early amniocentesis with amniofiltration does not provide any advantage over early amniocentesis techniques without amniofiltration or an advantage over the chorionic biopsy. The majority of authors agree that there are greater complications when these techniques are carried out during earlier stages of gestation.

There are no random studies for amniocentesis between weeks 13-15 that clearly demonstrate the effectiveness of early amniocentesis and amniofiltration and for that reason it should not be considered to be a safe procedure when compared with classic amniocentesis and biopsies of chorionic villi. In addition, at present techniques exist such as in situ hybridization with immunofluorescence and a chain reaction of the quantitative fluorescent polymerase that provide faster and safer cytogenic diagnosis of the majority of chromosomal abnormalities.

I. - E m b r i o l o g í a

I.1. Embriología del amnios y de la cavidad amniótica

Alrededor de dos semanas después de la última menstruación se inicia la formación de la cavidad amniótica; en el piso de esta cavidad en formación, las blastómeras del macizo celular interno inician la formación del embrión con la aparición de dos láminas: el epiblasto y el hipoblasto. Del epiblasto se desprenden los amnioblastos que migran y delimitan el espacio formado constituyéndose los amniocitos que darán origen a la membrana amniótica la cual formará el líquido amniótico (Fig1).

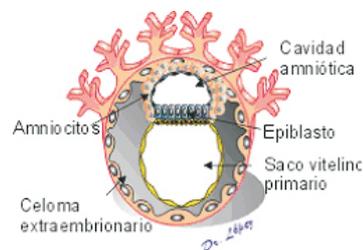


Figura 1. Esquema de un conceptus durante la formación de la cavidad amniótica

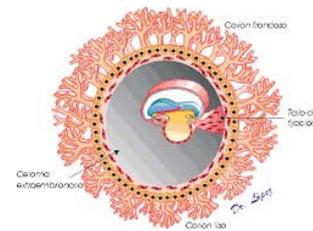


Figura 2 .Esquema que representa la vesícula coriónica con un embrión de aproximadamente 16 días

Durante la tercera semana, iniciada la gastrulación, aparecen el ectodermo, mesodermo y endodermo. En éste momento el embrión está conectado con el trofoblasto a través de un tallo de conexión, el primordio del cordón umbilical (Fig 2).

La membrana amniótica está adherida a los bordes del ectodermo del embrión de tal manera que cuando se inicia el proceso de plegamiento, los pliegues cefálico, caudal y laterales jalan la membrana amniótica de tal forma que el amnios envuelve al embrión. Este proceso se inicia antes de finalizar la tercera semana y termina al principio de la cuarta semana (Fig 3, 4 y 5).

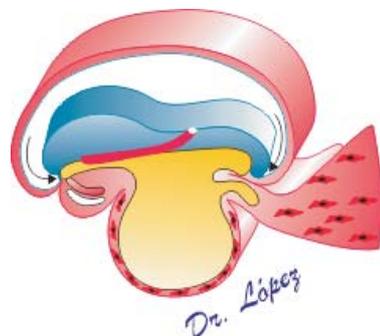


Figura 3. Ilustración sagital de un embrión. Durante la gastrulación. Las flechas indican los pliegues cefálico y caudal, esta última a nivel del pedículo de fijación.

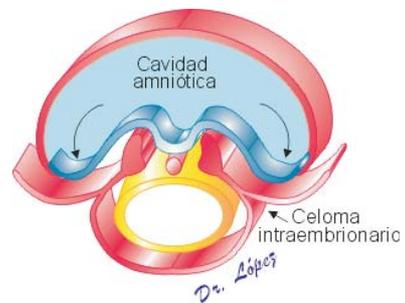


Figura 4. Ilustración transversal de un embrión durante la gastrulación. Las flechas indican los pliegues laterales.

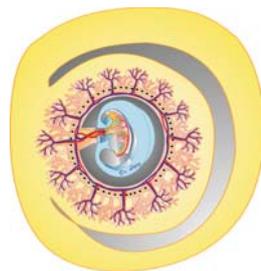


Figura 5. Ilustración de un *conceptus* implantado. El embrión ha terminado el proceso de plegación.

A la octava semana, la cavidad amniótica se ha expandido de tal forma que la membrana amniótica está en contacto íntimo con el corion liso originando la **membrana amniocoriónica**. Durante este proceso se oblitera la cavidad celómica extraembrionaria quedando un remanente a nivel del cordón umbilical, el cual permitirá el crecimiento extraembrionario del intestino delgado (Fig 6).

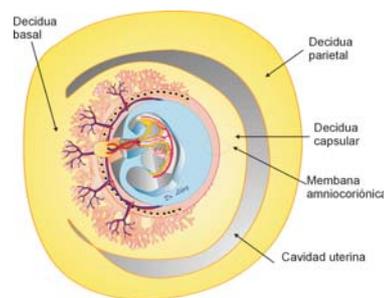


Figura 6. Ilustración de la formación de la membrana amniocoriónica

A la semana 14 del embarazo, la membrana amniocoriónica se fusiona con la decidua parietal desapareciendo la decidua capsular y obliterándose la cavidad uterina.

II. Líquido amniótico

La cavidad amniótica inicialmente contiene fluido producido por sus paredes celulares, pero la mayor parte procede de la sangre materna. La contribución de la orina fetal al líquido amniótico (LA) empieza a las 11-12 semanas de embarazo (Langhman J, 1986; Moore KL, 1999).

Entre las funciones del LA , tenemos que es un medio de protección fetal para las agresiones externas, así como durante las contracciones uterinas, mantiene además una temperatura fetal uniforme, constituye un ambiente óptimo para el crecimiento y desarrollo fetal, es un medio útil para valorar la salud y la madurez fetal, siendo además un medio para la administración de medicamentos al feto, es también un elemento favorecedor de la dilatación cervical permitiendo además el crecimiento simétrico y movilidad del feto (Pérez Sánchez A, 1992).

II.1 Composición del líquido amniótico y caracteres físicos

Al término de la gestación, la composición y las características físicas del LA, se resumen de la siguiente manera de acuerdo a Germain (1992).

- 1) Agua: entre el 98 al 99 %
- 2) Solutos: del 1 al 2 %, por partes iguales orgánicos e inorgánicos

- 3) Turbidez: aumenta con el tiempo de gestación
- 4) Peso Específico: en promedio 1,0078 g/ml
- 5) Valor Crioscópico: de alrededor de 0,504 °C
- 6) Presión Osmótica: de alrededor de 6,072 atmósferas a 0 °C
- 7) Gases: $pO_2 = 4$ a 43 mm Hg y $pCO_2 = 38$ a 50 mm Hg
- 8) pH: desciende de 7.13 antes de las 32 semanas a 7.08 desde esa edad gestacional (EG) en adelante.
- 9) Componentes Inorgánicos: no varían el Zn, Cu, St, Mn, Fe
- 10) Componentes Orgánicos:
 - a) Proteínas: tienen concentración 20 a 25 veces menor que en plasma materno, disminuyendo con la EG. La alfa-feto-proteína, originada en el hígado fetal se relaciona con defectos de cierre del tubo neural (DCTN).
 - B) Aminoácidos: su concentración en el LA es de un 50 a 75% menor que en plasma materno. Disminuyen con la EG.
 - c) Componentes nitrogenados no protéicos: urea, ácido úrico, creatinina; aumentan con la EG, especialmente por el aporte urinario fetal.
 - d) Lípidos: su concentración en LA varía con la EG. Los lípidos totales al término del embarazo oscilan alrededor de 13.61 mg%. Los lípidos polares representan un 69.50 % de ese total. Los fosfolípidos aumentan su concentración con la EG, siendo su

origen principalmente pulmonar (surfactante).

e) Carbohidratos: están presentes, en diferentes concentraciones, glucosa, sacarosa, arabinosa, fructuosa, lactosa. La concentración de glucosa verdadera es menor que en plasma materno, alcanzando al término 20 mg%

f) Vitaminas: las concentraciones de B-1 y C, son semejantes a las del plasma materno.

g) Enzimas: de significación y aplicación clínica no aclarada. La acetil-colinesterasa está relacionada con DCTN. La fosfatasa alcalina aumenta con la EG y en forma patológica en las pacientes pre-eclámpicas. A una determinada EG, la amilasa, aumenta en forma brusca después de las 36 semanas, por madurez fetal.

h) Hormonas: los corticoides, andrógenos, progesterona y sus metabolitos, gonadotropina coriónica, lactógeno placentario, renina, prostaglandinas, oxitocina. Las hormonas protéicas no pasan la placenta ni el amnios. Los esteroides puede ser eliminados por la orina fetal.

i) Citología: las células del LA proceden del amnios, mucosas y piel fetal. A las 14 semanas gestacionales, el LA es prácticamente acelular. Entre las 14 y 32 semanas se observa una escasa celularidad del LA, la que aumenta bruscamente a partir de las 37 semanas.

En el LA pueden encontrarse células del amnios, piel, vías genitourinarias, aparato respiratorio, tubo digestivo y en general todas presentarán el mismo cariotipo (Barch MJ, 1991).

Las dos fuentes primarias de líquido amniótico son la orina fetal y el líquido pulmonar, con una contribución pequeña adicional por secreción de las cavidades buconasales. Las dos principales vías de eliminación de líquido amniótico son la deglución fetal y la absorción hacia la sangre por riego de la cara fetal de la placenta.

II.2 Valoración del líquido amniótico

Valoración subjetiva: este método, en el que se comparan subjetivamente la cantidad relativa de zonas de líquido sin ecos con el espacio ocupado por el feto y la placenta es simple y rápido. Sin embargo, se requiere un observador muy entrenado para lograr resultados reproducibles, y la falta de un resultado numérico para señalar tendencias constituye una desventaja significativa.

Cúmulo vertical máximo: en esta técnica se mide el cúmulo de líquido amniótico aislado más amplio. Se define oligohidramnios como la ausencia de un cúmulo de líquido amniótico de al menos 1 cm y el polihidramnios corresponde a cualquier cúmulo mayor de 8 cm. Esta escala, que se ha adoptado ampliamente, tiene las desventajas de ser un resultado semicuantitativo y una potencia predictiva razonable para mal pronóstico gestacional.

Índice de líquido amniótico (ILA): este método implica sumar los cúmulos verticales máximos en cada uno de los cuatro cuadrantes del útero. Dada la conveniencia y reproducibilidad de este procedimiento, las circunstancias en que se incluye en las valoraciones ultrasonográficas y biofísicas fetales han aumentado significativamente (Moore T, 1997).

III. Tamizaje y diagnóstico prenatal

III.1 Introducción

Gracias a los diferentes métodos de tamizaje y diagnóstico prenatal, las parejas cuentan con múltiples opciones terapéuticas con respecto a su embarazo y pueden decidir si continúan o no con él (Kaback MM, 1993). Actualmente el número de infantes con malformaciones genéticas ha disminuido gracias a la incorporación de programas de diagnóstico prenatal; tal es el ejemplo de la enfermedad de Tay-Sachs, cuya incidencia ha disminuido hasta un 90% en países como Estados Unidos y Canadá (Kaback MM, 1993).

Más aún, hoy en día contamos con programas de diagnóstico prenatal más específicos y no invasivos, por lo que se ha disminuido el porcentaje de procedimientos como la amniocentesis, necesaria para el diagnóstico de anomalías congénitas; esto debido al uso de protocolos de tamizaje bioquímico o evaluaciones ultrasonográficas (DeVore GR, 2001; Haddow JE, 1994).

Las pruebas de tamizaje prenatal comprenden el asesoramiento preconcepcional, tamizaje materno bioquímico y la ultrasonografía. Además se cuenta con pruebas diagnósticas invasivas tales como: amniocentesis clásica, temprana y con técnica de filtración, la biopsia de vellocidades coriales, biopsia fetal y cordocentesis.

Gracias al advenimiento de nuevas técnicas de diagnóstico molecular citogenético, se cuenta con opciones como (hibridación in situ por fluorescencia (FISH), y reacción de la cadena de la polimerasa con cuantificación de fluorescencia (QF-PCR).

III.2. Asesoramiento preconcepcional.

Actualmente las parejas que están considerando el embarazo, tienen la oportunidad de discutir con el obstetra acerca de los riesgos potenciales que conlleva un embarazo, y así mismo conocer sus manejos y complicaciones.

Uno de los grandes avances en el asesoramiento preconcepcional es el uso de ácido fólico para la disminución de defectos en el tubo neural (DCTN) administrando una dosis de 0.4 mg diarios. Tal medida ha demostrado disminuir en un 50% (Czezel AE, 1992) defectos como espina bífida y anencefalia, incluso hasta en un 71% (MRC vitamin study research group, 1991).

Otro de los criterios importantes en el asesoramiento preconcepcional, es el grupo étnico de la pareja, ya que algunos padecimientos genéticos, particularmente los autosómicos recesivos, están ligados a grupos étnicos específicos. Por ejemplo, los hispanos tienen una incidencia de fibrosis quística de 1:9000 o de anemia de células falciformes con una incidencia de 1:576 (Gregg AR, 2002).

Además en el asesoramiento preconcepcional, los antecedentes familiares son de suma importancia para determinar factores de riesgo como abortos de repetición, óbitos así como malformaciones fetales que nos orienten a desórdenes genéticos (Bennett RL, 1999).

III.3. Tamizaje bioquímico materno

El concepto de tamizaje bioquímico, fue implementado en la década de los 70 con la determinación de alfa feto proteína para el cálculo de riesgo de DCTN. Actualmente el Síndrome de Down es la anomalía cromosómica mas frecuente y desde 1894, Merkatz reportó la asociación de bajos niveles de AFP con esta anomalía cromosómica. Esto hizo posible la implementación de tamizaje bioquímico para la detección de anomalías especialmente en pacientes de bajo riesgo.

El grado de detección para anomalías cromosómicas se hace aún mayor con la introducción de nuevos analitos séricos como la determinación de hormona gonadotrópica humana (hGC) y estriol no conjugado, logrando con esto un rango de detección para Síndrome de Down hasta de un 65% (Wald MJ, 1988). Un cuarto analito es la inhibina A (INH-A) el cual incrementa el rango hasta en un 75%. (Wald NJ, 1996). Además de la determinación para Síndrome de Down, esto a contribuido con la determinación de otras anomalías cromosómicas como son la trisomía 18, en la cual se encuentran disminuidos los niveles de hGC e INH-A (Canick JA, 1990). Una determinación de riesgo mayor de 1:270 se considera como prueba de tamizaje positiva, por lo que se deberá considerar una prueba diagnóstica de confirmación.

Otras publicaciones bibliográficas sugieren la asociación de estos analitos con otras malformaciones cromosómicas tales como Síndrome de Turner (Lambert-Messerlian GM, 1998), y otras triploidías (Benn PA, 2001). Existen reportes en la literatura dónde se relacionan niveles bajos de estriol no conjugado con el Síndrome de Smith-Lemli-Optiz (Bradley LA, 1999).

Comúnmente el triple y cuádruple marcador sérico se ofrecen de forma rutinaria a todas las pacientes de bajo riesgo entre las semanas 15 y 22 de gestación (Benn PA; 2002), aunque su uso se ha extendido a embarazos más tempranos.

Con respecto a tamizaje del primer trimestre, actualmente se ofrecen marcadores más tempranos que le brindan a la pareja más opciones incluyendo la de la terminación del embarazo (Wapner R, 2003), teniendo como gran desventaja la imposibilidad de valorar los DCTN.

Entre los marcadores bioquímicos que se ofrecen en embarazos del primer trimestre tenemos a dos grandes marcadores, el primero llamado proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) y como segundo marcador a la fracción libre de la hormona gonadotrópica humana (-hGC).

Se ha demostrado que los niveles de PAPP-A son menores en madres con anomalías fetales como Síndrome de Down hasta en un 5% cuando la edad materna es avanzada (Benn PA, 2002).

La concentración de hormona gonadotrópica humana está elevada en embarazos del primer y segundo trimestre complicados con Síndrome de Down con una tasa de estimación hasta del 45% si la edad materna es avanzada. (Cuckle HS, 1999). Cuando estos tres marcadores (PAPP-A, hGC y edad materna) están presentes el rango de detección es de hasta el 65% (Benn PA, 2002).

III.4. Ultrasonografía

El uso de ultrasonografía dirigida, también llamada de II nivel, permite identificar anomalías en el crecimiento fetal y anomalías cromosómicas tales como trisomías 13, 18 o Síndrome de Turner (Ville YG, 1998). A pesar de las implicaciones clínicas que conlleva una anomalía fetal, se requiere del cariotipo fetal para determinar su pronóstico así como las opciones terapéuticas y cálculo de riesgo. Para tal fin se ofrecen de forma habitual procedimientos invasivos como la amniocentesis.

En la actualidad existen marcadores ultrasonográficos como la longitud femoral, humeral, ecogenecidad del foco intracardíaco, ecogenecidad intestinal, pieloectasias renales e incremento en la translucencia nuchal. Dichos marcadores carecen de consecuencias clínicas adversas, sin embargo se han relacionado con anomalías cromosómicas (Nyberg DA, 2001).

Estudios han demostrado que la ultrasonografía de segundo nivel detecta anomalías hasta de 25% en fetos con Síndrome de Down, incrementándose hasta en un 50% cuando se evalúan de forma sistémica otros marcadores (Nyberg DA, 2001).

Uno de los marcadores ultrasonográficos del primer trimestre más comprometidos es la translucencia nuchal (TN), que consiste en la medición de la colección líquida localizada detrás del cuello fetal. Un incremento en la medida estándar se asocia en gran medida con anomalías genéticas como el Síndrome de Down (Nicolaidis KH, 1992), trisomía 13, 18, Síndrome de Turner y otras triploidías (Snijders RJM, 1998). De igual forma, una disminución en la TN se ha asociado a una gran variedad de síndromes genéticos y anomalías cardíacas (Nicolaidis KH, 1999). Para poder establecer el estándar de la TN, la medida de corte se establece para la edad gestacional específica (Pandya PP, 1995).

A pesar de todo lo anterior, la ultrasonografía tiene sus limitaciones, tales como que la mayoría de los estudios de investigación están basados en poblaciones de alto riesgo por lo que falta interpretar estos mismos marcadores en poblaciones de bajo riesgo, dado que falsos positivos podrían provocar ansiedad a la pareja por la necesidad de estudios diagnósticos invasivos. Por lo tanto se requiere determinar el valor predictivo de estos marcadores ultrasonográficos (Nyberg DA, 1995).

El tamizaje de anomalías fetales del primer trimestre se puede mejorar con la combinación de marcadores séricos y ecográficos tales como TN (Nicolaidis KH, 2003), logrando con esto una tasa de diagnóstico prenatal de hasta el 90% (Orlandi F, 1997).

Gracias a todos estos avances con respecto a marcadores bioquímicos y ecográficos, es posible ofrecer a toda la población de bajo riesgo pruebas de tamizaje más seguras y certeras, reduciendo de esta manera el número de pacientes que requieren de métodos de diagnóstico invasivos, sin contar la ansiedad por una probable pérdida gestacional.

III.5. Pruebas diagnósticas invasivas

El diagnóstico prenatal se ha convertido en una parte importante de la consejería genética. La primer amniocentesis con fines terapéuticos fue realizada en 1930 por Menes y col. con el propósito de tratar a una paciente con polihidramnios. En los años cincuenta se realizó con propósitos genéticos por Serr y colegas (1955). Fuchs y Riis (1956) reportaron por primera vez el sexo de forma antenatal, pero no fue hasta 1966 cuando Steele y Berg analizaron las células de líquido amniótico para efectuar cariotipos diagnósticos. En 1968, Valenti y Nadler recomendaron el diagnóstico prenatal para el diagnóstico de Síndrome de Down, la galactosemia y la mucopolisacaridosis, a partir de la práctica de la amniocentesis transabdominal (Dexeus S 1989, Fuente-Pérez P 1984, Bonilla MF, 1983). Es desde entonces que la técnica ha convertido en el pilar fundamental en el diagnóstico prenatal de alteraciones cromosómicas, bioquímicas y/o enzimáticas.

Actualmente la *amniocentesis* es la técnica más utilizada en diagnóstico prenatal (Reece EA, 1997), para la detección de anomalías cromosómicas y genéticas, ofreciendo así a familias un examen prenatal de su embarazo (Himes P, 1999) siendo esta una decisión de pareja en un 64.7%, concentrándose su angustia en los daños fetales, aborto y la espera (Cederholm M, 1999)

La amniocentesis fue realizada en un principio como un procedimiento a ciegas cuyo sitio de inserción de la aguja era determinado por palpación (Harrison R, 1975). Con el advenimiento de la ultrasonografía de tiempo real, varios autores han reportado una disminución de amniocentesis no exitosa, así como el número de punciones necesarias para llevarla cabo (Crandon AJ, 1979; Romero R, 1985).

En 1985, Lenke reportó la ventaja de la técnica de mano libre con un solo operador para el monitoreo ultrasonográfico durante la amniocentesis. Esta técnica es ahora ampliamente utilizada para procedimientos invasivos diagnósticos y terapéuticos.

Desde la introducción de la amniocentesis como técnica de obtención de material para estudio del cariotipo fetal, esta se ha practicado clásicamente entre las 15 y las 17 semanas de gestación (Reece A, 1997), convirtiéndose en el modelo de referencia para

comparar técnicas dirigidas a obtener tejido fetal para diagnóstico prenatal. La amplia experiencia de que se dispone sobre la amniocentesis avala su fiabilidad y seguridad. Además, su relativa facilidad técnica la convierte en el método más accesible para los centros de asistencia no pertenecientes a tercer nivel. Las expectativas del público general avanzan al mismo ritmo que el conocimiento científico y médico.

Los avances en biología molecular, ecografía, acceso precoz al saco gestacional y diagnóstico prenatal han ayudado tanto a conducir como a reunir dichas expectativas.

Dentro de este contexto, la amniocentesis del segundo trimestre continúa siendo el procedimiento invasivo más seguro, reportándose un riesgo de pérdida fetal no mayor al 1% en embarazos únicos, (Tongsong 1998; McGowan KW, 1991). En embarazos gemelares hay estudios que reportan un éxito de la técnica del 93% con un riesgo de pérdida fetal de 1.2% (Pijpers L, 1988), sin embargo si se efectúa en un medio hospitalario de tercer nivel, la incidencia de complicaciones disminuye hasta un 0.22% (Nassar A, 2000).

La biopsia corial (BVC) y la amniocentesis precoz (AP) como procedimientos diagnósticos mas tempranos, están asociadas con un riesgo más alto de pérdida gestacional subsiguiente (Jauniaux E, 1992; Nicolaides H, 1994; Sundberg K, 1997).

Pero hay otros factores que deben tenerse en cuenta. Existe 10 veces más riesgo de mosaicismos en la BVC cuando se compara con la amniocentesis y ello obliga a la realización de un mayor número de técnicas invasivas de confirmación en el grupo de pacientes sometidas a AP (Sundberg K, 1997).

En la casi obsesiva polémica centrada en la realización de amniocentesis o biopsia corial para diagnóstico citogenético precoz, la última revisión efectuada por Cochrane Database System Review (Alfirevic Z, 2000) incluyó tres estudios. El fallo de obtención de muestra fué del 4.0% en la amniocentesis precoz comparada con el 2% en el grupo de biopsia corial (riesgo relativo 0.23, IC del 95% 0,08 a 0,65). En consecuencia necesitaron un segundo procedimiento de diagnóstico prenatal y más mujeres en el grupo de BVC (riesgo relativo 0.43, IC 95% 0.21-0.88).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en los fallos de laboratorio o en el número de mujeres con fetos portadores de anomalías cromosómicas. Hubo más abortos espontáneos tras la AT y no hubo diferencias en la incidencia de distrés respiratorio neonatal y anomalías en los recién nacidos. La incidencia de deformidades fetales fue mayor en el grupo con amniocentesis precoz mientras que los hemangiomas fueron mas frecuentes en el grupo con biopsia corial.

Los autores concluyeron que debía sopesarse la aplicación de la AT por su mayor riesgo de deformidades fetales frente a la presencia de más hemangiomas en el grupo con BVC transabdominal.

La BVC ha sido estudiada por diferentes autores. El mayor estudio fué el realizado por Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group en 1989. El resultado indicó que si hay un riesgo incrementado de aborto asociado a la BVC. La magnitud de este riesgo aumentado no puede ser mayor al 2.7%, los hallazgos referentes a la asociación de la biopsia corial con anomalías por reducción en las extremidades pusieron en duda su relativa seguridad (Firth HV, 1991a; Hsieh EJ, 1995).

La amniocentesis precoz o temprana (AT) se propuso como posibilidad casi al mismo tiempo en que la amniocentesis de segundo trimestre se generalizaba como técnica de diagnóstico prenatal (Watchel E, 1969).

Existen reportes de 1978-79 dónde se analizaron mas de 1000 AT en embarazos simples, dónde el índice de aborto espontáneo fué de 1.7%, con una precisión en el diagnóstico del 100% (Henrion R, 1978; Henrion R, 1979). En la década de los 90 se apuntó como una técnica que podía reunir los mejores criterios de seguridad, fiabilidad y ejecutabilidad. Los estudios preliminares sugirieron que la fiabilidad de la AT era similar a la de la amniocentesis del primer trimestre (Penso CA, 1990; Hanson FW, 1992), sin embargo hay autores que hacen mención de que la AT es una técnica no inocua pero deberá considerarse únicamente en pacientes con indicación precisa (Gardella C, 1986). Otros autores refieren que la extracción de grandes cantidades de líquido amniótico en amniocentesis tempranas provocan el mal desarrollo de los pulmones fetales, de las extremidades, posiblemente

contribuyan a los abortos y anomalías congénitas relacionadas con el procedimiento (Tharmaratnan S, 1998).

Existen situaciones predictivas de complicaciones. Por ejemplo, se menciona que el llevar a cabo la amniocentesis antes de la semana 13 de gestación es el mayor factor predictor de complicaciones (Winsor EJ, 1999).

Por otra parte la AT tiene dos graves problemas: hasta la fecha hay pocos estudios que se dirijan adecuadamente a la cuestión crítica de la seguridad de la AT con respecto a la AC que es el estándar de oro en diagnóstico prenatal y además, el estudio de los amniocitos sigue precisando de un cultivo previo con lo cual el resultado citogenético se obtiene a las 3 semanas de haber realizado el procedimiento.

Sundberg y Smidt-Jensen describieron en 1991-1992 una amniocentesis modificada en la que el líquido amniótico se aspiraba a través de un filtro que retenía a los amniocitos. El líquido aspirado se reinstalaba después en la cavidad amniótica y con ello se obtenía una cantidad de células muy superior a la amniocentesis convencional (Sundberg K, 1995a). Este estudio se realizó en 30 pacientes entre las 13-19 semanas de gestación y la cantidad de líquido extraído fue de 16 ml, 7 ml para control, 7 ml que se pierden en el espacio muerto del sistema de filtración y 2 ml para la medición de AFP.

En estudios subsecuentes han realizado amniofiltraciones

removiendo así menor cantidad de líquido amniótico y reportando bajos fallos en cultivo en comparación con BVC y AT (Sundberg K, 1994; Sundberg K, 1996; Sundberg K, 1999).

Otros estudios especializados que brindan información de células fetales son la cordocentesis y la biopsia fetal (BF), pero están restringidas a condiciones especiales y tienen un mayor riesgo de pérdida fetal comparado con la amniocentesis o biopsia corial.

La cordocentesis, realizada exitosamente por primera vez por Daffos en 1983, se utiliza principalmente en alteraciones fetales hematológicas o para obtener un cariotipo fetal rápido cuando la edad gestacional se acerca a la permitida para interrupción del embarazo en los países en los cuales es permitido (Rudigoz DC, 1990).

La biopsia fetal está indicada principalmente para ciertos defectos genéticos de piel, como la epidermiólisis bullosa. Anteriormente se utilizaba la biopsia de hígado fetal para diagnosticar la deficiencia de ornitina transcarbamilasa y se ha utilizado la biopsia de músculo fetal para el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne y algunas alteraciones mitocondriales. Es difícil determinar la seguridad y certeza de la biopsia fetal debido a que la experiencia con este procedimiento es limitada (Dalton ME, 1993).

III.5.1 INDICACIONES

El diagnóstico prenatal de cromosomopatías debe formar parte del cuidado prenatal en los siguientes grupos de mujeres: (Guizar J, 1994; Gersen SL, 1999)

1. Edad materna avanzada (35 años o más)
2. Alguno de los miembros de la pareja portadores de rearreglo cromosómico
3. Antecedente de hijo previo con cromosomopatía
4. Estudios sugestivos de feto con cromosomopatía (TMS, ultrasonido)
5. Doble o triple marcador positivo (Writters I, 2002)
6. Translucencia nual ecográfica mayor o igual de 3mm (Salvensen DR, 1995)

Existen otras indicaciones relativas del estudio, como consanguinidad, angustia materna, entre otras, por lo que cada caso debe ser evaluado en forma específica.

III. 6. Amniocentesis clásica

La amniocentesis del segundo trimestre realizada después de las 15 semanas de embarazo ha sido utilizada por más de 25 años constituyendo la piedra angular del diagnóstico prenatal invasivo.

Actualmente este procedimiento presenta pocas complicaciones gracias al advenimiento de la ultrasonografía, pero aún no se ha logrado que sea inocua, siendo las complicaciones más frecuentes la ruptura de membranas, infección, sangrado vaginal, isoimmunización Rh y trauma fetal, calculándose el riesgo de pérdida fetal de aproximadamente un 0.5 a 1% (Tabor A, 1986).

TÉCNICA

La amniocentesis clásica o del segundo trimestre se efectúa posterior a una fetometría ultrasonográfica, y siempre usando ultrasonografía tiempo real ya que es así que será determinado el sitio placentario (Lynch L, 1992). Dicho sitio deberá contar con una adecuada bolsa de líquido amniótico, sin partes fetales ni cordón umbilical, evitando puncionar el sitio de inserción del cordón umbilical por la posibilidad de punción de algún seno venoso. Previo protocolo de asepsia del área, con la colocación de campos estériles adecuados, se coloca protector estéril en el transductor del ecógrafo, se coloca gel estéril sobre el área a puncionar, utilizando una aguja espinal o epidural de 20-22 g, la cual se introduce a través de la pared abdominal y uterina,

se retira el estilete y se procede a obtener el LA. La cantidad de LA oscilará entre los 20-30 mm o se calcula a 1 ml por semana de gestación. Se tira el primer cc de LA para evitar contaminación con células maternas, así como el LA con tinte hemático. Una vez efectuado el procedimiento se deberá verificar la vitalidad fetal. Se recomienda no puncionar más de dos ocasiones para evitar incrementar la posibilidad de aborto espontáneo (Fig 8).

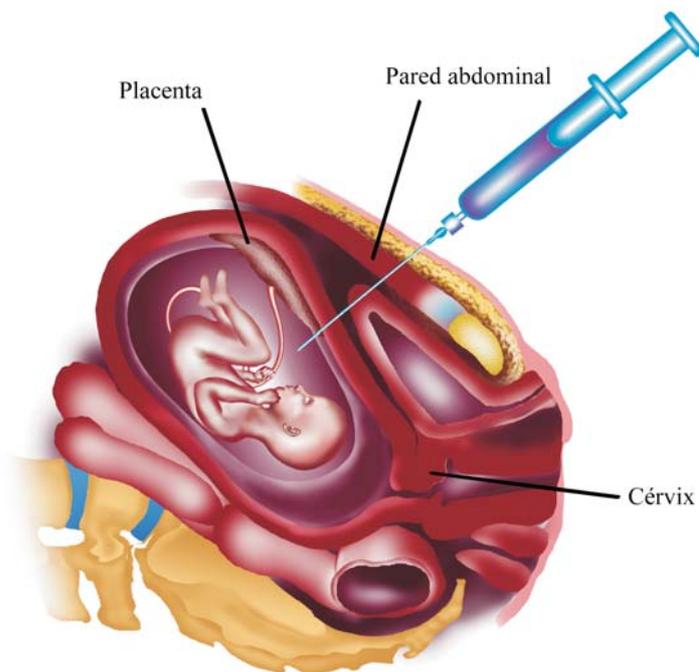


Figura 8. Amniocentesis transabdominal. Obtención de LA para su estudio citogenético o bioquímico

III.7. Amniocentesis transplacentaria

Existe evidencia de que la posibilidad de aborto espontáneo posterior a una amniocentesis transplacentaria es alta (Harrison R, 1975; Hess LW, 1986; Karp LE, 1997), sin embargo existen reportes dónde se concluye que la localización placentaria no se encuentra asociada al aborto espontáneo (Crane JP, 1984). Existen además estudios que concluyen que la amniocentesis con punción transplacentaria tiene la misma incidencia de complicaciones que la no placentaria, sin embargo es más frecuente el goteo sanguíneo (Bloody taps) (Bravo RR, 1995). Existe una rara complicación reportada de exsanguinación con muerte fetal posterior a la punción de un hematoma subcoriónico o de una laguna vascular placentaria (Young PE, 1997).

III.8. Complicaciones

Entre las complicaciones posteriores al procedimiento tenemos la salida de líquido transvaginal, sangrado o goteo transvaginal y contracciones uterinas, las cuales son generalmente transitorias y autolimitadas (Lele AS, 1982). Aproximadamente en el 1 a 2% persiste la salida de líquido transvaginal posterior a la punción (Tabor A, 1986), sin embargo hay casos reportados de la persistencia de la pérdida transvaginal durante todo el embarazo. La infección del amnios se presenta en 1 de cada 1000 procedimientos (Murken JA, 1979).

En relación a la AT, las complicaciones menores son sangrado, salida de líquido transvaginal, cólicos, infección uterina (Penso CA, 1990) y hematomas en el amnios (Diaz-Vega M,1996), las cuales no se relacionan con el aborto espontáneo (Tharmaratnam S, 1998).

En cuanto al seguimiento a largo plazo, Baird y col. (1994) efectuaron un estudio donde analizaron 1631 nacidos de madres con el antecedente de amniocentesis clásica no encontrando diferencia con el grupo control. Sin embargo no se cuenta con información de seguimiento de pacientes de madres con el antecedente de AT (Penso CA, 1990)

Blumfield y col. (1996) encontraron que la salida de líquido o sangrado transvaginal ocurría mas frecuentemente en pacientes con AT que en la clásica y con un mayor número de pérdidas gestacionales (2.2% vs 0.2%), por lo que concluyeron en su trabajo que la amniocentesis temprana tiene mayor número de complicaciones que la AC. Sin embargo, su incidencia puede variar de 0% (Assel BG, 1992) a 2.7% (Smidt-Jensen S, 1992)

En cuanto a la eficiencia citogenética en la AT, Eiben y col. (1994) reportaron un estudio donde analizaron 1554 muestras de LA obtenidas con AT, encontrando un reporte exitoso del cariotipo en un 99.7%, con un tiempo medio de 14.5 días, reportando solo un pseudomosaicismo. Además hay evidencia bibliográfica de que no existe diferencia significativa con respecto a su eficiencia, pseudomosaicismos o

contaminación celular materna en la AT y AC, con un reporte de eficiencia en el cultivo de LA de un 99.3% (Penso CA, 1990).

Entre los factores predictivos para dificultad técnica tenemos útero en retroversoflexión, sangrado pre-amniocentesis, fibrosis, técnica transvesical, técnica transplacentaria, índice de masa corporal alto, oligohidramnios, arrastramiento de la membrana amniótica, hipertensión materna y con cierta incertidumbre la paridad de la paciente que cuando es mayor, aumenta la posibilidad de pérdida fetal. Para cuestiones prácticas, dentro de los factores relacionados de forma directa con la pérdida fetal tenemos al sangrado y salida de líquido transvaginal (Johnson JM, 1999).

Eiben en 1997(c) determinó que la tasa de aborto después de la semana 28 de gestación en pacientes sometidas a AT y AC no representaba diferencia significativa (2% y 1.3% respectivamente) por lo que concluyó que la AT es un método seguro, alternativo a la BVC y la AC.

En este mismo año Cederholm, publica los resultados de 147 mujeres con AT y de 174 BVC, encontrando una alta incidencia de abortos espontáneos de un 6.8% en el grupo de AT y de 1.7% para el grupo de BVC. Además encontró que en el grupo de mujeres sometidas a AT, el fallo en el cultivo representó el 19% de las muestras, mientras que en la BVC fué de 5.2%, concluyendo en este estudio prospectivo que tanto en la AT y BVC la incidencia de aborto espontáneo es alta y que la necesidad de repetir el examen es alta sobre todo en el grupo de AT.

Sin embargo, hay estudios prospectivos dónde concluyen que la AT es un procedimientos seguro y alternativo a la BVC para ofrecerle a la paciente un diagnóstico prenatal (Daniel A, 1998), además de contar actualmente con técnicas citogenéticas avanzadas dónde podemos efectuar un análisis para la detección de ciertas aneuploidías con técnicas tales como FISH (hibridación in situ con fluorescencia) y QF-PCR (Fluorescencia cuantitativa con reaccion de cadena de polimerasa) de forma rápida (Miny P, 2002).

III. 9. Amniocentesis precoz o temprana

La amniocentesis temprana tiene la gran ventaja de ofrecer de una forma más temprana y exacta el diagnóstico prenatal tanto de anomalías cromosómicas, bioquímicas y de defecto del tubo neural (Hanson FW, 1992), así como para la detección de toxoplasmosis congénita (Foulon W, 1990), ofreciendo la oportunidad de inducir el aborto de una forma más segura reduciendo así el trauma social y psicológico (Ledbetter DH, 1990; Hanson FW, 1992; Nevin J, 1990, Bakharev VA, 1991). Dada la gran cantidad de LA que se requiere para un estudio citogenético adecuado, el desarrollo pulmonar y de extremidades se ve comprometido (Hislop A, 1992), sin embargo existe evidencia de que una menor cantidad de LA (7cc) es efectiva y segura para un adecuado estudio citogenético (Tharmaratnam S, 1998), lo que representa una buena alternativa a la BVC (Rebello MT, 1991; Rooney DE, 1989; Viscarello RR, 1991; Benacerraf BR, 1988). La AT de las semanas 10 a la 12, se compara en cuanto a seguridad, complicaciones, pérdidas fetales con el mismo éxito de diagnóstico citogenético que la AC (Diaz-Vega M, 1996).

Debido a las limitaciones de la biopsia corial, la amniocentesis realizada antes de la semana 15 de gestación ha tomado progresivamente una mayor importancia como técnica de obtención de material fetal para estudio citogenético. Es por esto que algunos autores la consideran como el estudio clave entre la AC y BVC (Lindner C, 1990).

Además esta se realiza en épocas precoces de la gestación siendo una técnica fácil evitando así algunas de las dificultades diagnósticas inherentes a la biopsia corial .

En los últimos años se ha discutido a nivel internacional sobre las ventajas e inconvenientes de la amniocentesis precoz (Djalali M, 1992, Nicolaides KH, 1994; Eiben B, 1997a; Eiben B, 1997b, Farrán I, 1993; Winsor EJ, 1999). Para algunos de ellos, la amniocentesis precoz es una técnica con grandes posibilidades como método de obtención de tejido fetal para el estudio del cariotipo en amplios grupos de población porque la simplicidad de la técnica, aunada a su precocidad en el tiempo de gestación la hace preferible a la amniocentesis clásica. Para otros, la amniocentesis precoz es inadmisibile ya que representa mayor riesgo para el feto que la amniocentesis clásica o la biopsia corial.

Las diferencias en el material empleado, calibre de las agujas, y en el procedimiento seguido, así como en el reposo postpunción, hacen que los resultados de los diversos grupos de trabajo no sean equiparables.

En la experiencia de Bombard (1992), Farrán (1993), Yang (1993), Eiben (1993), Gabriel (1993), la amniocentesis precoz es un procedimiento que puede reunir buenos criterios de seguridad, fiabilidad y ejecutabilidad. Cuando se trata de estudiar un cariotipo de rutina, los citogenetistas prefieren el líquido amniótico.

Shulman en 1994, efectuó un estudio comparativo de 250 pacientes que dividió en dos grupos, los cuales fueron estudiados con BVC y AT. A través de esto se observó que existe mayor posibilidad de aborto espontáneo en el grupo de pacientes sometidas a AT que en el grupo de BVC, por lo que concluye que la AT no puede ser tomada en cuenta como una herramienta de DP temprano, sugiriendo que solo un estudio randomizado de cohorte podrá valorar y determinar la seguridad del procedimiento.

III.9.1 Amniocitos en amniocentesis precoz

La amniocentesis precoz a las 12 semanas proporciona suficiente material como para obtener un resultado citogenético ya que en este período de la gestación hay una proporción mayor de células viables que a las 16 semanas (Farrán, I 1997). Por la necesidad de extraer menor cantidad de líquido amniótico en épocas tempranas de la gestación y éste ser más pobre en células, se necesita de un período de tiempo de cultivo más largo para el sacrificio de las colonias y se presenta un mayor índice de fallos de cultivo que el descrito para las amniocentesis realizadas entre las 15 y las 17 semanas. De hecho, los estudios realizados por Djalali (1992) demuestran que sólo a partir de las 12 semanas se obtiene un número adecuado de células para poder asegurar que se obtendrá un resultado citogenético fiable. Efectivamente, empleando los criterios de "número de colonias" y "duración del cultivo hasta el sacrificio" las muestras cultivadas a las 13 y 14 semanas no difirieron de las conseguidas a las 15 y 16 semanas respectivamente, aunque algunas de las muestras obtenidas a las 13 semanas mostraron cierto retraso en el tiempo de cultivo.

La amniocentésis clásica se realiza entre las 15 y 17 semanas de gestación, momento en que el número de células es muy superior pero en que la proporción de células viables no ha aumentado en relación directa con el número total de células.

A continuación la tabla 1 describe brevemente las diferencias importantes entre los métodos invasivos de DP. AM y AC según Reece EA (1997).

Tabla 1. Diferencias entre la amniocentesis temprana y clásica

	Amniocentesis temprana	Amniocentesis clásica
Complicaciones	<ul style="list-style-type: none"> ● 2.0 - 3.0%. ● 2.3% (Penso CA, 1990) ● 4% de abortos (Sundberg K, 1995b) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 0.5%
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ● Técnica mas fácil que la BVC ● Resultados mas rápidos ● Menor número de complicaciones postaborto 	<ul style="list-style-type: none"> ● Técnica mas fácil que la AT ● Menor tiempo de cultivo ● Menos complicaciones que la AT
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ● Mayor tiempo de cultivo ● Mayor número de mosaicismos ● Mayor número de complicaciones respiratorias y óseas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tiempo de espera mayor para resultados ● Alto número de complicaciones postaborto

A continuación la tabla 2 describe brevemente las diferencias importantes entre los diferentes trabajos publicados en relación a la amniocentesis temprana

Tabla 2. Revisión bibliográfica comparativa sobre amniocentesis temprana

Autor	Muestra	Edad gestacional	Tamaño de la Aguja (G)	Falla en la toma (%)	Punción trans-placentaria	Seguimiento (%)	Pérdida gestacional
Hanson, 1987	541	13.6	20	*	SI	55	4.7
Godmillow, 1987	600	12-14	20	1.6	*	90	3.1
Elejalde, 1990	322	12.9	20	0.2	*	97.5	2.5
Hanson, 1990	527	13.4	20	0.2	SI	98	2.3
Nevin, 1990	222	13.4	20	0	SI	100	1.9
Penso, 1990	407	12.6	22	*	SI	95.5	3.8
Stripparo, 1990	505	13.7	22	0.3	*	99.6	3.4
Trayer, 1990	348	13.6	*	2.7	*	92	3.4
Hackett, 1991	106	13.0	20	2.8	NO	61	3.2
Hanson, 1992	936	12.3	22	0.1	SI	100	3.4
Henry, 1992	428	13.1	22	1.0	SI	94.1	1.6
Díaz-Vega, 1996	181	10-12	22	1.6	*	100	1.6
Johnson, 1999	2172	12.1	*	2.1	*	99.11	7.6

* valor no disponible

III.10. Malformaciones congénitas o disfunciones anatómicas tras la AT y BVC

Se ha sospechado pero no comprobado la presencia de malformaciones congénitas tras la amniocentesis y biopsia de vellosidades coriales, a pesar de que existen estudios experimentales con animales que apoyan la pérdida de LA tras la amniocentesis temprana como causa de las complicaciones pulmonares (Hislop A, 1992, Yuksel B, 1997).

Milner (1992), reportó el seguimiento inmediato de 39 recién nacidos sometidos a amniocentesis y los comparó con un grupo control de 43 recién nacidos de las mismas características sin el antecedente de amniocentesis, no encontrando diferencia significativa en cuanto a edad gestacional, peso, volumen de gas respiratorio y capacidad vital de llorar.

Thompson y col. (1991) compararon la función pulmonar neonatal después de amniocentesis y BVC del primer trimestre, midiendo las capacidades funcionales residuales en neonatos de 2 a 8 semanas no encontrando diferencia significativa, lo que sugiere que la amniocentesis y la BVC en el primer trimestre no tienen efecto en el crecimiento pulmonar pero no se ha concluido que estos procedimientos no tengan efecto y consecuencias en el desarrollo pulmonar.

Existe un estudio prospectivo de 1994 del grupo de Calhoun en el que se reportó un 20% de complicaciones pulmonares tras la amniocentesis temprana y clásica, entre las cuales se encontraron congestión crónica, asma y bronquiolitis.

La incidencia reportada de dificultades respiratorias tras la AT en recién nacidos a término es del 1% (Henry GP, 1992).

En cuanto a la AT, hasta la fecha no se cuenta con estudios randomizados dónde se analicen sus complicaciones y efectos a largo plazo. Rousseau y col. (1995) efectuaron un estudio no randomizado en el que se compararon la AT vs BVC, dónde consideraba la edad materna avanzada. La falla de cultivo no mostró diferencia estadística significativa reportándose sólo un 0.8% en su falla en cuanto a pérdidas gestacionales, recién nacidos pequeños para su edad gestacional y defectos estructurales. No se encontró diferencia estadística significativa entre ambos grupos de estudio. En otro reporte, de Nicolaides y cols (1994) encontraron que la incidencia de muerte intrauterina era más alta en el grupo de AT que el grupo de BVC. Igualmente, la incidencia de pie equinovaro era mayor en el grupo de AT que en el grupo de BVC pero sin diferencia estadística significativa. Otras malformaciones congénitas como talipes y dislocación congénita de cadera o rodilla se han reportado posteriormente a la amniocentesis. En 1991, Hackett reportó a partir del estudio de 62 recién nacidos con el antecedente de amniocentesis temprana (11-14 semanas), 4 recién nacidos con anomalías congénitas como ano imperforado, hemangioma de la lengua y dos talipes, los cuales no

requirieron tratamiento, sin embargo existe literatura que indica que la prematurez así como el bajo peso al nacimiento no son más frecuentes que en la población en general, reportando un 6.1% de complicaciones pulmonares. Este mismo estudio indica además que las deformidades ortopédicas, escoliosis, dislocación congénita de rodillas y pie zambo, tienen relación con pérdida de LA tras la punción (Penso CA, 1990; García Álvarez F, 2002). En 1994, Crandall reportó 693 AT y no encontró diferencias estadísticas significativas con respecto a anomalías congénitas comparadas con el grupo de AC.

En relación a la dislocación de la rodilla, continúa su etiología en controversia ya que la incidencia es extremadamente rara y se ha asociado además a Síndrome de Larsen (Haga N, 1997), con la presentación pélvica por limitación del espacio intrauterino y oligohidramnios (Bensahel H, 1989, Niebauer JJ, 1960).

Jonhson reportó en 1996 los resultados de un estudio aleatorio comparando la AT con la AC, encontrando que el porcentaje de anomalías congénitas fué de 2.4% y 2.6% respectivamente. Las complicaciones respiratorias estuvieron presentes en un 2.2% y 1.6% respectivamente. Las anomalías musculoesqueléticas como pie zambo y dislocación de cadera se presentaron en 1% y 2.6% respectivamente, no encontrando diferencia significativa entre los dos grupos.

En un estudio publicado por Nicolaidis en 1996, analizó de forma prospectiva a 1492 mujeres, las cuales fueron sometidas a AT y BVC y estableció que la incidencia de pie equinovaro fué de 1.6% en el grupo de AT. En otro estudio, Yoon (2001) reportó una incidencia de pie equinovaro de 1.1% y de un 0.48% en el grupo de BVC. La tasa de aborto espontáneo fué mayor en el grupo de AT.

En 1997(a), Greenough publicó los resultados de un estudio para valorar el impacto de la AT o BVC en la morbilidad respiratoria a través de un cuestionario a un año del procedimiento, demostrando un exceso de niños sintomáticos en el grupo de AT comparado con el grupo de BVC. Además demostraron un exceso de admisiones hospitalarias por complicaciones pulmonares en niños que fueron sometidos a AT, por lo que concluyeron que procedimientos invasivos del primer trimestre están asociados con una alta incidencia de morbilidad respiratoria. En otro estudio publicado por este mismo autor (1997b) se concluyó que las madres que se sometieron a AT pudieran tener mayor número de complicaciones en el RN, por lo que sus bebés tienen una alta tasa de internamientos en la unidad de cuidados intensivos neonatales; probablemente por problemas respiratorios, aunque esta asociación es rara.

Crandall (1994) y Wilson (1997) publicaron sus resultados sobre la incidencia de anomalías congénitas, la cual fué de 2.4% para AT y de 2.6% para AC. La incidencia de complicaciones musculares tras estos procedimientos fué de 0.9% y 2.4% respectivamente. Debido a esto concluyeron que la AT es un método diagnóstico alternativo a la AC y BVC.

En 1999, Delisle concluyó que las complicaciones postprocedimiento son ligeramente mayores a las publicadas con anterioridad en 1998 por el grupo Canadiense de Amniocentesis temprana y precoz (CEMAT), encontrando una incidencia mayor en relación a las malformaciones musculoesqueléticas, falla en el cultivo y salida de líquido amniótico, por lo que esto deberá formar parte de consentimiento informado de la paciente.

A pesar de numerosos estudios que tratan de explicar la etiología del pie equinovaro, sobre la que existen mas de diez teorías, la Dra. Mariza de Andrade (1998) propuso una nueva teoría en referencia a un trastorno recesivo ligado al sexo de pobre penetrancia. Sin embargo, la teoría más aceptada es que la disminución en la cantidad de líquido amniótico provoca una reacción humoral y fisiológica microcelular materna (Tredwell SA, 2001).

En su estudio, Nikkila (2002) afirmó que las mujeres programadas para amniocentésis entre las semanas 11.5 y 14.6 presentan un alto riesgo de tener un recién nacido con deformidades en la piel.

En un estudio retrospectivo donde se analizó un total de 2378 mujeres con el antecedente de amniocentesis y triple marcador alterado, se observó un total de 4.1% de complicaciones. Entre las más frecuentes tenemos al Síndrome de anomalías múltiples y malformaciones cardíacas y renales, por lo que concluyeron que

pacientes con marcador alterado era un grupo con embarazos en riesgo de presentar anomalías cromosómicas numéricas, pero también síndromes de etiología desconocida (Witters I, 2002).

A pesar de toda la información no concluyente, deberán tenerse siempre presentes las posibles consecuencias respiratorias y deformaciones tras la realización de amniocentesis clásica o temprana.

Existe el reporte dónde hace referencia de que técnicas como la AT y BVC deberán abandonarse por su alto índice de complicaciones (Jauniaux E, 2000a).

III.11. Amniofiltración en amniocentesis temprana

Sundberg (1991) y Smidt-Jensen (1992) describieron una amniocentesis modificada en la que el líquido amniótico que se aspira pasa a través de un filtro que retiene a los amniocitos, el líquido aspirado se reinstala en la cavidad amniótica. Con ello se obtiene una cantidad de células muy superior a la obtenida por amniocentesis convencional. En este primer estudio el tamaño de la muestra es escaso (30 gestantes), y a pesar de que circularon por el filtro 20 ml de líquido amniótico, en el espacio muerto quedaron solo 7 ml, no se definieron resultados perinatales y los resultados no se pudieron reproducir en otros grupos (Fonseca ML, 1992; Torrents M, 1994; Farran I, 1997) ya que utilizaban filtros con poros pequeños los cuales se colmataban fácilmente y obstruían el circuito dificultando así el procedimiento.

Fue hasta 1995(a), cuando Sundberg y col. reportaron el uso de la amniofiltración para mejorar el cultivo celular de la AT, encontrando una alta incidencia de abortos espontáneos con esta nueva técnica, pero similar a la de BVC.

Sundberg publicó en 1996 un trabajo en el cual utilizó la amniofiltración en aquellas pacientes con el antecedente de BVC con mosaicismos, sugiriendo esta técnica como alternativa para esclarecer los mosaicismos; esto con el fin de dar un resultado temprano y oportuno.

En 1997, Sundberg y col. publicaron un estudio randomizado en el que sí incluyeron los resultados perinatales; pero tuvieron que detener el

estudio debido a la aparición de complicaciones neonatales tales como pies equinovaros. En el estudio realizado, se empleaba una aguja de 20 gauge y los autores no mencionan en la metodología si las pacientes realizaban o no reposo postpunción.

En 1994 (Farran) se inició en el Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d`Hebron en Barcelona, España; un estudio prospectivo sobre amniofiltración con el objetivo de evaluar la importancia de la amniofiltración como procedimiento para diagnóstico prenatal citogenético. El proyecto se desarrollo en tres fases: la primera fase tenía como objetivo el aprendizaje del manejo del circuito del filtrado. En la segunda fase se puso en marcha el cultivo del material filtrado. La tercera fase se enfocó a la aplicación clínica. Durante estas fases se llegaron a utilizar hasta 3 filtros. Como resultado de este estudio actualmente solo se utiliza un filtro con un sistema sencillo.

La técnica de punción no difiere de la universalmente aceptada para la amniocentesis, aunque pueden distinguirse las variantes extra y transplacentaria. La tendencia actual es no evitar la punción transplacentaria en la amniocentesis, sobre todo la precoz ya que la superficie placentaria es el lugar dónde más firmemente adheridos se hallan corion y amnios. Por lo tanto, la punción transplacentaria disminuiría la posibilidad de un "efecto tienda de campaña" que dificulte la punción. A pesar de todo, se debe ser cuidadoso para no lesionar inadvertidamente la inserción del cordón umbilical.

Las agujas empleadas varían su grosor en los diferentes equipos de trabajo, pero oscilan entre los 20 y los 22 Gauge.

Se han empleado distintos tipos de filtros con poro entre 0,25 μ m y 0,65 μ m. Sundberg y col.(1995b) no hallaron diferencias en los resultados citogenéticos empleando filtros de 0,45 μ m y 0,65 μ m, pero Fonseca y col. (1992) encontraron que los filtros con poro de 0,25 μ m que habitualmente se emplean para los trabajos en bacteriología, tenían peor rendimiento. En la experiencia previa de los autores (Farran I, 1997), los filtros de 10 cm^2 de superficie proporcionan un mejor rendimiento del material filtrado y menos complicaciones intraprocedimiento.

El número y tipo de filtros empleados influye sobre el espacio muerto del circuito y por lo tanto, en la cantidad de líquido que se sustrae definitivamente de la cavidad amniótica. Así, el modelo que emplea un filtro tipo Millex tiene un espacio muerto de 1,5 ml y el modelo que emplea 3 filtros tipo Sterivex de 7 ml, no es nada despreciable cuando se trata de una técnica destinada a extraer menor volumen de líquido amniótico. Por otra parte, cuanto mayor es el número de conexiones, mayor es la posibilidad de un fallo de estanqueidad que comprometa el desarrollo del procedimiento.

En el plano económico, cuanto más complejo es el circuito de filtrado, más cara resulta la técnica.

No hay equipos prefabricados de amniofiltración. Todos los grupos que están realizando la técnica ensamblan su propio circuito utilizando material que normalmente está disponible en todos los hospitales. El ajuste de cada una de las piezas debe realizarse a conciencia porque es sumamente fácil que se pierda la estanqueidad con las consecuencias previsibles: entrada de aire y/o contaminación. El modelo de circuito, con un solo filtro cilíndrico, que se muestra en la Fig. 9 es el que se emplea actualmente en nuestra Unidad.

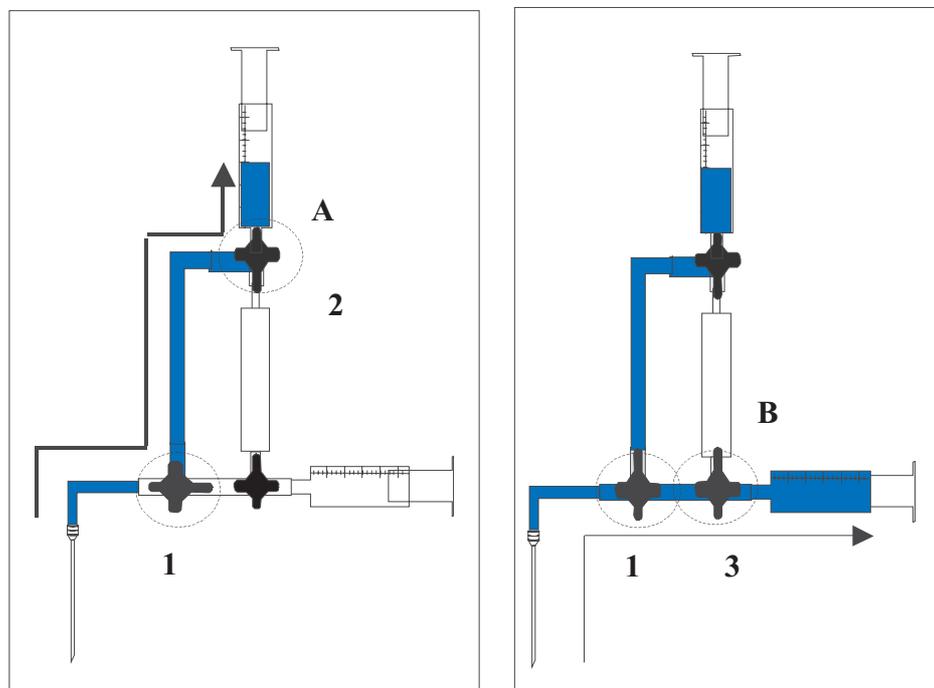


Fig 9. Circuito para la amniofiltración empleado en la actualidad

III.11.1 Semanas de gestación para amniofiltración

La amniofiltración consiste en una amniocentesis precoz con sistema de filtrado, por lo que las semanas de gestación son equivalentes a las utilizadas en esta técnica (11-14 semanas).

III.11.2 Cantidad de líquido amniótico para realizar la amniofiltración

Se realiza la aspiración de 10 ml de LA por cada sesión, el cual es posteriormente devuelto a la cavidad amniótica previo paso por el sistema de filtrado. Al final, la cantidad de líquido amniótico utilizado es de 4 a 8 ml.

III.11.3.Cantidad y tipo celular (“viabilidad celular”)

La filtración y reinyección de líquido amniótico en las amniocentesis precoces permite obtener mayor número de células de buena calidad aptas para cultivo, con una extracción mínima de líquido amniótico. Además, las muestras obtenidas por filtración precisan de un menor tiempo de cultivo para el sacrificio, mejorando así el tiempo de diagnóstico citogenético.

III.12. Biopsia de vellosidades coriales

Los primeros intentos para la obtención y aplicación de vellosidades coriónicas en el diagnóstico prenatal, durante el primer trimestre del embarazo, se realizaron desde hace más de dos décadas. Álvarez en 1995, obtuvo una biopsia de placenta por vía transabdominal con la que pudo diagnosticar una mola hidatidiforme.

El uso de vellosidades coriónicas para el diagnóstico citogenético fué iniciado por Mohor en 1968 al obtener un fragmento de corion por vía cervical, con ayuda de un endoscopio adaptado. Estas biopsias se utilizaron para la realización de cariotipos, pero la insuficiente visibilidad sólo permitió la obtención de tejido útil en el 50% de los casos.

Hahnemann (1997) trató de resolver el problema técnico, derivado del uso del endoscopio, pero el elevado porcentaje de complicaciones y la baja proporción de obtención de muestras, así como la deficiente visualización de la placenta, hizo que solamente unos cuantos investigadores siguieran valorando la técnica en el primer trimestre. Sin embargo en 1975 se utilizó por investigadores chinos para determinación del sexo. En 1977 en Estados Unidos se utilizó una técnica en la que se realizó aspiración de células placentarias de descamación por lavado endocervical, con 50% de éxito en cultivo celular pero con alto índice de contaminación con células maternas. En 1979 se realizó en la Unión Soviética y dos años más tarde en países europeos. En 1983 en la universidad de Milán se reportó un método

directo para el estudio del cariotipo fetal. Brambati reportó en 1998 el uso de este método orientado por ultrasonido y obtuvo en el 80% de los casos material adecuado. En la literatura han aparecido reportes en relación a complicaciones asociadas con la biopsia corial como contaminación con células maternas, mosaicos placentarios, infecciones, sangrado y pérdidas fetales.

Los grupos de Simoni (1983) y Spencer (1988) mostraron que la BVC durante el primer trimestre de embarazo podía ser un procedimiento fidedigno para el análisis cromosómico, por lo que se considera una ventaja definitiva para poder realizar la interrupción del embarazo, en una etapa mas temprana comparada con la amniocentesis.

En los siguientes años una gran cantidad de estudios confirmaron ese hallazgo. Sin embargo, es obvio que existen discrepancias citogenéticas entre el tejido extraembrionario y el propio feto en aproximadamente 1.5 % de los casos (Hahnemann J, 1997). En la mayoría de los casos, esto es debido a una anomalía cromosómica restringida al tejido extraembrionario, mientras que el feto posee un cariotipo normal, fenómeno llamado mosaicismo confinado a placenta (MCP). Más frecuentemente una capa de la vellosidad corial, el citotrofoblasto presenta un mosaico trisómico, mientras la otra capa, el núcleo del mesénquima y el feto presentan una constitución cromosómica normal.

Para el entendimiento de este fenómeno, es necesario conocer la

estructura de las vellosidades coriales así como el desarrollo embrionario temprano. Al final del primer trimestre una vellosidad típica consiste de tres capas: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto y núcleo de mesénquima. El sincitiotrofoblasto no posee ningún potencial mitótico y por lo tanto no es importante para el análisis citogenético. El citotrofoblasto es caracterizado por una alta tasa de división celular y provee casi exclusivamente de metafases a las preparaciones directas y cultivos de término corto. Las células del núcleo del mesénquima generalmente no muestran una actividad mitótica espontánea, pero estas recobran su ciclo celular cuando se cultivan por disgregación mecánica o digestión enzimática (Wegner RD, 1995). Estos cultivos de término prolongado necesitan aproximadamente de una a tres semanas de crecimiento para obtener un número suficiente de células para preparaciones cromosómicas.

Una desventaja específica de la BVC, es que las muestras no representan la totalidad del corion, sino solo a un simple sitio geográfico. Las células de un sitio pueden no ser típicas de la totalidad del corion, y se tiene la posibilidad de obtener un resultado que no corresponde al feto; por lo cual se deben interpretar cuidadosamente los resultados de las BVC para proveer bases confiables para el diagnóstico prenatal.

En particular, el mayor número de discrepancias de la constitución cromosómica entre el citotrofoblasto y el embrión, comparado con el

número encontrado entre el núcleo del mesénquima y el embrión puede llegar a ser obvio, considerando los siguientes puntos:

- La estirpe celular que da origen al citotrofoblasto se separa tempranamente del linaje embrionario. Las aberraciones cromosómicas que ocurren en el citotrofoblasto inmediatamente después de su diferenciación no afectan al linaje embrionario (comprende también las células determinadas a formar el núcleo del mesénquima). La probabilidad de sufrir una mutación es aproximadamente 20 veces mayor para el trofoblasto, comparado con la masa celular interna. Así, estudios en ratón mostraron que el feto es derivado de tres células progenitoras de la masa celular interna del blastocisto de 64 células, mientras que todas las demás células, se dedican a formar el trofoblasto.

- Muy frecuentemente, las discrepancias pueden ser debidas al fenómeno llamado rescate trisómico. En casos de cigotos trisómicos, la no disyunción mitótica o rezago anafásico pueden conducir a la pérdida de un cromosoma supernumerario produciendo mosaicismo. La fuerza de la selección natural en contra de la línea celular anormal es mucho mayor sobre el desarrollo del embrión que en el tejido extraembrionario. Los diversos mosaicos posibles dependen del tiempo de la embriogénesis y de la localización del rescate trisómico.

III.12.1 . Indicaciones para BVC del primer trimestre:

Portadores de translocación familiar.

Alteraciones ligadas al cromosoma X (Vega H, 1991)

Madre de más de 35 años.

Sospecha de anomalías cromosómicas, debido a defectos fetales observados en la búsqueda ultrasonográfica.

Hallazgos ultrasonográficos (Brambati B, 2002)

Tamiz bioquímico alterado

Examen de paternidad

Se cuenta con dos técnicas citogenéticas para el procesamiento de las BVC, las cuales son usadas para conocer los cariotipos de poblaciones celulares diferentes:

1. Directa o cultivo de término corto. Proporciona el cariotipo de células del citotrofoblasto.
2. Cultivos de término prolongado. Proporciona el cariotipo de células del mesénquima.

Estas técnicas deben ser usadas no como alternativas sino como complementarias, para incrementar la probabilidad de éxito, calidad y esclarecer los mosaicismos confinados a placenta.

Obteniendo una buena muestra de BVC de 10 mg o más, las preparaciones directas pueden producir un resultado mayor del 97 % de los casos, pero la morfología de los cromosomas puede ser pobre, ocasionando problemas en el bandeo y en un tercio de los casos no se pueden bandear adecuadamente. Alrededor del 1% de los casos presentan mosaicismo confinado a placenta. En más del 97 % de los cultivos celulares, se obtiene un resultado citogenético, con una mejoría en las bandas. El MCP puede encontrarse en el 1% de los casos y la contaminación con células maternas en el 0.5 % .

En el 2002, Brambati publicó los resultados de 1844 pacientes sometidas a BVC en dos diferentes períodos de tiempo, el primer grupo entre las semanas 13 y 14, y un segundo grupo entre las semanas 15 y 20, no encontrando diferencias significativas en cuanto a complicaciones, abortos así como eficiencia en el resultado citogenético, por lo que concluye que la BVC es relativamente segura si se practica tanto a finales del primer trimestre e inicios del segundo.

III.12.2. Interpretación de los resultados de BVC.

No es posible interpretar completamente los resultados de las BVC por ambas técnicas; directa y en cultivo, pero existen algunas estrategias para obtener una indicación confiable del cariotipo fetal.

a) Cariotipo normal 46, XY ó 46, XX. Obteniendo un resultado

normal en preparaciones directas, es improbable que las células en cultivo alteren este diagnóstico. Por azar, las células dentro de un blastocisto en mosaico, pueden dar surgimiento a un feto anormal, con citotrofoblasto normal. La incidencia de tales resultados falsos negativos es demasiado baja para ser considerada, pero se corre el riesgo de un falso negativo en 2 000 a 5 000 mil embarazos.

- b) Trisomía 13, 18, 21 o triploidía constitutiva. Éstas dan un diagnóstico fetal preciso en casi todos los casos. Han sucedido errores aislados pero están representados por debajo del 1%; esta tasa de error es aceptable y la interrupción del embarazo es recomendada.
- c) Rearreglos familiares. Obteniendo una buena cantidad de bandas los rearreglos familiares conocidos pueden ser diagnosticados confiablemente usando solo preparaciones directas.
- d) Sexo fetal. La incidencia de contaminación de células maternas en preparaciones directas es extremadamente baja.
- E) Trisomía 2. Es una anomalía común usualmente en mosaico de cultivos celulares. No hay casos bien documentados de esta trisomía en tejido fetal.
- f) Trisomía 3. Es una anomalía común de preparaciones directas, éstas pueden ser en mosaico o regulares, pero raramente han sido encontradas en fetos viables.

- g) Mosaico de trisomía 13, 18 ó 21. Pueden presentarse en preparaciones directas, cultivos celulares o ambos. Alrededor del 30 % representan anomalía fetal.
- h) Trisomía de otros cromosomas, incluyendo 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 20 y 22 han sido reportadas. Éstas pueden ocurrir en preparaciones directas y en cultivos celulares y se presentan en mosaico o constitutivas. Éstas ciertamente representan mosaicismo confinado a placenta, ro las trisomías 7, 8, 9 y 20 son descartadas como candidatos para amniocentesis o sangre fetal, aún cuando todas las células de las preparaciones directas y cultivadas tienen una de esas trisomías. Esta no es suficiente evidencia para sugerir que el feto sea anormal.
- i) Marcadores cromosómicos en mosaico constitutivos, deben ser seguidos de amniocentesis o sangre fetal. Alrededor del 50 % son genuinos.
- j) Anormalidades de cromosomas sexuales constitutivas. Si se presentan en preparación directa y en cultivo son genuinas en más del 25 % de los casos. El estudio realizado únicamente en preparaciones directas no es absolutamente confiables.
- k) Mosaicos de anomalías de sexocromosomas no son indicadores confiables del cariotipo fetal. Más de la mitad de estos pueden no estar presentes en el feto. Existen numerosos ejemplos como monosomía 45, X en preparaciones directas en asociación con cultivos 46, XX o 46, XY. En estos casos el cariotipo es

invariablemente normal. La sangre fetal o amniocentesis pueden definir el verdadero cariotipo fetal en los casos de mosaicismo de sexocromosomas.

- l) Rearreglos estructurales inesperados deben ser tratados por amniocentesis para confirmar el evento de *novo*.
- m) En general no se considera el mosaico de anomalías estructurales. Así mismo deben ser cuidadosos de errores de interpretación debido a la contaminación por células maternas en cultivos de término prolongado. Mosaicos triploides deben ser confirmados por amniocentesis o sangre fetal.

III. 12.3. Semanas de gestación en que se realiza la BVC

La biopsia de vellosidades coriales es realizada en el primer trimestre de embarazo entre la semana 9 y 12 de gestación en promedio, de acuerdo a la mayoría de los grupos de trabajo en esta técnica de diagnóstico prenatal. La ventaja de realizarla en esta edad gestacional temprana es reducir el stress físico y emocional en las parejas de riesgo, maximizar la privacidad de los pacientes y permitir diagnóstico citogenético rápido para así permitir la interrupción del embarazo a una edad gestacional temprana cuando se considere apropiado, de acuerdo al diagnóstico y al status legal de cada población.

III.13. Cordocentesis

Se define como la obtención de sangre fetal a través de la punción transcutánea del cordón umbilical. Fué descrita por primera vez por Daffos en 1983 .

Ésta técnica revolucionó la forma del diagnóstico prenatal en sus inicios, esto por que ofrecía una rápida evaluación del cariotipo fetal, además permitía evaluar el crecimiento intrauterino, anomalías plaquetarias fetales, hidrops fetal, infecciones fetales así como también hemoglobinopatías, permitiendo además la aplicación de medicamento. A pesar de considerarse un procedimiento con altas posibilidades de complicaciones, la tasa de pérdida fetal es de un 0.8% (Daffos F, 1983). El procedimiento se realiza bajo condiciones estériles, con ultrasonografía continua, se punciona la pared uterina con aguja 22G, se localiza la base del cordón umbilical, puncionándola. Posteriormente se obtiene una muestra de 3 ml, en jeringa heparinizada.

Usualmente se realiza en la semana 20, dado que antes el diámetro del cordón dificulta la técnica.

En manos experimentadas, la obtención de sangre fetal, sin complicaciones es posible hasta en un 95% de los casos (Hickok DE, 1992).

III.14. Biopsia fetal

Método de diagnóstico raramente usado, dado que se usa para diagnosticar enfermedades cutáneas hereditarias como la epidermolisis bullosa. Sin embargo, algunos autores optan por este método para confirmar mosaicismos identificados por otros métodos, tal como amniocentesis o biopsia corial (Berghella, 1998).

La técnica se efectúa a finales del segundo trimestre, bajo condiciones estrictas de asepsia y se utiliza aguja 17G. Con respecto a las complicaciones, un estudio de 54 procedimientos no demostraron complicaciones fetales así como pérdidas fetales (Nicolini U, 1992).

III.15. Diagnóstico citogenético

Las técnicas de citogenética molecular han complementado y mejorado la capacidad de análisis cromosómico en el diagnóstico prenatal.

La técnica de citogenética molecular mas usada hoy en día es el FISH, en la cual se utilizan sondas de DNA marcadas con un fluorocromo para posteriormente hibridarse con una región específica del ADN. Los principales tipos de sondas, incluyen sondas para locus específicos, sondas con fluorocromos y sondas secuenciales. Las primeras marcan un locus específico cromosomal, por lo que permite detectar microdelecciones, regiones específicas subteloméricas, tales como para el Síndrome DiGeorge (22q11.2), Síndrome de Angelman (15q11.2 mat), Síndrome de PraderWilli (15q11.2 pat) y Síndrome de Cri-du-chat (5p15.2).

Con respecto a la sonda subtelomérica, analiza todo el cromosoma y nos ayuda a determinar síndromes dismórficos así como retardo mental entre otros. Este tipo de sonda, nos ayuda a determinar desarreglos cromosómicos paternos en aquellos pacientes con historia familiar. En caso de determinar un desarreglo en específico se indica una FISH prenatal con sondas específicas.

Con respecto al diagnóstico prenatal, el tipo de sonda más utilizada es la marcada con fluorocromo, el indica daño en un cromosoma específico. Para esto se utilizan células en interfase sin cultivar obtenidas a partir del LA, VCS, sangre fetal, orina fetal o líquido

de un higroma quístico. Esta técnica permite detectar aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y. Esta revolucionaria técnica permite efectuar un rápido diagnóstico prenatal (Miny P, 2002).

Dado a lo laborioso y costoso de estas técnicas, en Europa se desarrolló una técnica denominada QF-PCR, en la cual se utilizan marcadores ADN polimórficos de la mayoría de las trisomías y aneuploidías (Adinolfi M, 2001), permitiendo de ésta forma ofrecer un diagnóstico en 24 a 72 horas.

Actualmente se desarrollan chips de ADN con microarreglos con clones genómicos, los cuales permiten la determinación de microdelecciones, análisis subteloméricos y bandeo de alta definición, analizando de ésta manera el genoma de forma mas completa (Antonarakis SE, 2001).

IV. M o s a i c i s m o p l a c e n t a r i o

El análisis del cariotipo del tejido placentario puede ser difícil de interpretar en presencia de mosaicismo placentario confinado (feto normal con placenta trisómica) y el rescate del cigoto trisómico (feto trisómico con un cariotipo placentario normal).

El mosaicismo, que consiste en la presencia de 2 líneas celulares con diferentes complementos cromosómicos dentro del mismo individuo, es detectado en el 1% de los especímenes CVS (Kuliev A, 1996) y puede desarrollarse por 2 mecanismos: un error meiótico en un gameto puede producir un producto trisómico, o como consecuencia de las divisiones meióticas tempranas una de las células puede perder el cromosoma extra, "rescatando" el cigoto trisómico, formando una línea normal dicigótica.

El MCP del rescate mitótico puede conducir a una disomía uniparental, que sucede cuando el embrión trisómico original es rescatado, pero dejado con un par de cromosomas originado del mismo progenitor. Esto puede tener consecuencias clínicas si los cromosomas involucrados traen información de genes, cuya expresión es independiente del progenitor de origen o si los dos cromosomas restantes contienen un gen recesivo que sería homocigótico. Por ejemplo, 15 % de los casos del Síndrome de Prader Willi resultan de una disomía materna uniparental para el cromosoma 15.

Los errores mitóticos pueden producir también mosaicismos con la distribución y porcentaje de células aneuploides dependientes del tiempo de la no disyunción. Si ocurre un error tempranamente en el desarrollo, este podría segregarse hacia la masa celular interna y tener el mismo potencial de producir un feto afectado como los errores meióticos. Si el error ocurre después de la compartamentación de la célula esto sólo conducirá hacia anomalías citogenéticas en sólo un linaje celular.

El mosaicismo detectado en los especímenes CVS es confirmado en el feto sólo en el 10 al 40 % de las veces. Esto difiere de la amniocentesis del segundo trimestre en la cual el mosaicismo se observa en solo 0.1 al 0.3 % de los casos, pero puede ser confirmado en los fetos arriba del 70% de las veces. Las anomalías estructurales de los cromosomas fueron confirmadas en solo el 8.6 % de los casos mosaicos.

Debido a la alta probabilidad de que los resultados mosaicos involucren sólo la placenta; se requiere una amniocentesis para averiguar si el feto está exento de anomalías; pero de cualquier forma, el alcance del trabajo depende del cromosoma. La amniocentesis demuestra el cariotipo fetal verdadero en aproximadamente 94 % de los casos, aunque existen discrepancias. Estos son casos en los que la amniocentesis revela falsos negativos.

Cuando se encuentra mosaicismo, bajo ninguna circunstancia deben ser tomadas decisiones acerca de la posible terminación del embarazo basado únicamente en los resultados del CVS. Si están involucradas trisomías comunes, la amniocentesis debe ser considerada, pero la posibilidad de un resultado falso negativo debe discutirse y el seguimiento pudiese entonces incluir ultrasonografía, cordocentesis o biopsia de la piel fetal. En ciertos casos la prueba para la disomia uniparental será indicada.

V. Estudio citogenético del líquido amniótico

Los amniocitos sobreviven en el líquido de 2 a 3 días pero lo ideal es sedimentarlas para su cultivo inmediatamente después de su obtención. El botón se resuspende en un medio de cultivo y se le deja reposar durante 4 a 7 días, después de lo cual las células se asientan y forman colonias (Figura 10). Éstas pueden subcultivarse para extender la línea celular y mantener el crecimiento. Las células se cosechan a los 8 a 14 días después de la siembra inicial y su ciclo se detiene en metafases por la adición de la colchicina. Tras ser teñidas se les examina con el microscopio óptico para observar el patrón de bandas cromosómicas específicas. La morfología de las células halladas en el líquido amniótico es variada.

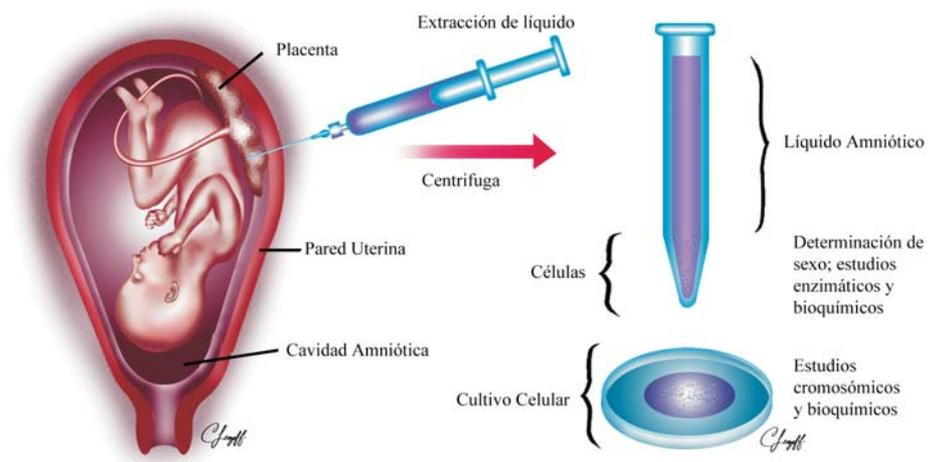


Figura 10. Estudio citogenético de LA

No es frecuente que las células maternas contaminen los cultivos de líquido amniótico porque su supervivencia es limitada y son sensibles al tratamiento con tripsina que se aplica al material de estudios citogenéticos, sin embargo puede presentarse la contaminación ocasionalmente. Por lo tanto, se recomienda eliminar los primeros tres mililitros del líquido obtenido para descartar esta posibilidad (Nuss S, 1994; Alberts B, 1998).

Es importante mencionar que el éxito en el cultivo de amniocitos en la AT se debe a que existe el mismo número de amniocitos que en la AC (Byrne D, 1991).

Durante el análisis citogenético de líquido amniótico puede observarse contaminación por células maternas, cuya presencia se demuestra por análisis de PCR, donde son generados fragmentos de longitud variables (Rebello MT, 1994).

VI. Justificación

VI. justificación

En la actualidad, los esfuerzos realizados en lo referente a medicina perinatal se basan en identificar tempranamente los problemas materno-fetales. Específicamente en DP es de suma importancia encontrar un método que logre el equilibrio entre la precocidad del diagnóstico, la confiabilidad en la técnica y la seguridad en la misma, por lo cual en el presente estudio se compararon tres métodos de diagnóstico prenatal: a) amniocentesis precoz con amniotilación, b) amniocentesis precoz convencional (sin amniotilación) y c) biopsia de vellosidades coriales para identificar las ventajas y desventajas de cada método, así como sus complicaciones. La intención del presente trabajo fué determinar su utilidad para así elegir el mejor procedimiento que permita un diagnóstico prenatal veraz y oportuno.

El diagnóstico prenatal en su forma más simple, ha causado inquietud desde la antigüedad. A principios de siglo pasado los investigadores empezaron a examinar los líquidos corporales de la madre para determinar el sexo fetal antes del nacimiento y el líquido amniótico se convirtió en la fuente de información más usada (Guizar J, 1994).

Schatz en 1881 fue el primero en proponer la amniocentesis, sin embargo Henkel fue el primero en llevarla a cabo hasta 1919, pero no

fué hasta 1955 cuando Serr examinó de forma directa la cromatina sexual en células de líquido amniótico para determinar el sexo fetal. En 1966 Steele y Breg informaron los primeros resultados de estudios de cariotipo mediante cultivos de células de líquido amniótico.

En los últimos años dado el gran interés en el estudio de los defectos congénitos y alteraciones bioquímicas o metabólicas; el diagnóstico prenatal ha tenido grandes avances tecnológicos con el fin de disminuir la tasa de mortalidad perinatal.

La disminución de la tasa de natalidad en el mundo occidental, crea la necesidad de asegurar a la madre y a su familia un hijo sano que no afecte tanto económica como psicológicamente el entorno familiar y a la sociedad en general. Es por esto que se recomienda el empleo de las técnicas de diagnóstico prenatal en todas las familias con riesgos (Dexeus S, 1989), dado que los defectos congénitos son los responsables de más del 20% de las muertes durante el período de 0-4 años (Fuente-Pérez P, 1984).

Las posibilidades de diagnosticar prenatalmente defectos congénitos aumentan en cuanto la tecnología lo permite, siendo la ecografía un importante apartado en el diagnóstico prenatal, ya que el avance en el ultrasonido de tiempo real a permitido identificar pacientes con riesgo de cromosomopatías (ACOG, 1999), así como el tamizaje bioquímico para cálculo de riesgo de cromosomopatías, lo cual influye directamente sobre un aumento de la demanda de

técnicas invasivas guiadas por ultrasonografía para confirmar el diagnóstico de alteraciones en el cariotipo fetal.

Existen estudios de técnicas de diagnóstico prenatal no invasivas como el muestreo de sangre materna e incluso de moco cervical en busca de células fetales, pero estos estudios aún se encuentran en investigación y no han brindado resultados satisfactorios que sean reproducibles para así ser aplicados en forma generalizada a la población (Hahn S, 2001). Por lo tanto, cuando se trata de obtener muestras para el análisis citogenético debemos remitirnos obligadamente por el momento a las técnicas invasivas de diagnóstico prenatal como son la amniocentesis con sus variantes (Frydman R, 1993), biopsia de vellosidades coriales, de piel, así como cordocentesis, y embrioscopia (Wilson RD, 1995). Ya que éstas técnicas son invasivas, siempre deberemos tener presentes sus complicaciones; siendo la más temida y poco deseada para la madre la pérdida del embarazo.

Por lo anterior, se han desarrollado técnicas de diagnóstico prenatal no invasivas como el muestreo de sangre materna e incluso de moco cervical en la búsqueda de células fetales, pero estos estudios aún se encuentran en desarrollo y no han brindado resultados satisfactorios que sean reproducibles y aplicados en forma generalizada a la población (Bianchi DW, 1990).

Por todo lo anterior es necesario desarrollar un método invasivo para un adecuado estudio citogenético con el menor número de

complicaciones materno-fetales que asegure la tranquilidad materna en el procedimiento así como efectividad en los resultados. Es por esto que se decidió comprobar la efectividad de la amniotomía así como sus complicaciones, para determinar si es un método de diagnóstico prenatal invasivo seguro y confiable.

VII. Planteamiento del problema

VII.1.hipótesis

La técnica de amniotiltración permitirá un diagnóstico prenatal más rápido, sencillo, seguro, reproducible y con menos complicaciones materno-fetales en etapas tempranas de la gestación, en comparación con la biopsia de vellosidades coriales y la amniocentesis precoz convencional.

VII.2. Objetivo general y específicos

VII.2.1. Objetivo general.

- Analizar el método de amniotiltración, sus ventajas e inconvenientes en comparación con los métodos existentes como la biopsia corial y la amniocentesis precoz sin amniotiltración.

VII.2.2. Objetivos específicos.

- Comparar el tiempo necesario para realizar cada procedimiento, los fallos en el cultivo, así como las complicaciones intraprocedimiento y post-procedimiento de cada técnica.

V I I I . M a t e r i a l y m é t o d o s

VIII.1. Población de muestra

Se incluyeron 921 mujeres candidatas a cariotipo fetal con 9.5 a 13.6 semanas de gestación, de las cuales a 310 pacientes se les realizó biopsia corial, a 302 pacientes amniocentesis precoz con amniotilación y a 309 pacientes amniocentesis precoz convencional sin amniotilación.

VIII.2. Criterios de inclusión

- 1.- Gestación con feto único.
- 2.- Ecografía realizada en el primer trimestre de gestación congruente con amenorrea.
- 3.- Indicación para estudio fetal mediante técnicas invasivas según criterios de la European Study Group for Prenatal Diagnosis.
- 4.- Consentimiento escrito informado para la realización de la técnica.

VIII.3. Criterios de exclusión

- 1.- Gestantes portadoras de embarazo múltiple.
- 2.- Gestantes con patología añadida sea propia o no del embarazo.

VIII.4. Consentimiento informado.

Toda paciente candidata a practicarse una técnica invasiva para diagnóstico prenatal acude a una consulta de asesoramiento, en la cual se le explica detalladamente el riesgo-beneficio de realizar o no el procedimiento, así como la totalidad de los diferentes métodos actuales alternativos, con referencia explícita a sus posibles inconvenientes y complicaciones.

VIII.5. Procedimiento de amniocentesis precoz

Como protocolo antiséptico, el transductor se hallaba inmerso en una solución antiséptica (dilución al 4.5% de Instrunet^R esporicida).

La pared abdominal se aseptizó en dos fases: la primera con solución de clorhexidina y la segunda fase con alcohol de 96°.

Previa identificación del punto de punción mediante ecografía, se realizó la punción bajo control ecográfico continuo hasta alcanzar la cavidad amniótica, procediendo posteriormente a la extracción del mandril y a la aspiración de la primera fracción de líquido amniótico (1 cc), mediante una jeringa de insulina, que se desechó en todos los casos. Posteriormente se extrajo 1 cc de líquido amniótico por semana de edad gestacional .

Realizada la amniocentesis precoz, se procedió a realizar una nueva ultrasonografía para confirmar vitalidad fetal.

Representación



VIII.6. Procedimiento de biopsia corial transabdominal

Como medio antiséptico, el transductor se hallaba inmerso en una solución antiséptica (dilución al 4.5% de Instrunet[®]).

La pared abdominal se aseptizó en dos fases: la primera con solución de clorhexidina y la segunda fase con alcohol de 96°.

Previa identificación del punto de punción mediante ecografía, se realizó la punción con aguja de 20G bajo control ecográfico continuo hasta alcanzar la placenta lo mas alejado de la decidua. Procediendo a la extracción del mandril , se conecta una jeringa de 20cc realizando vacío; se procede a efectuar movimientos de vaivén bajo presión negativa y se retira la aguja sin ejercer presión negativa en ella.

La muestra se coloca posteriormente en un medio de transporte. Realizada la biopsia corial, se procede a efectuar nueva ultrasonografía para confirmar vitalidad fetal.

Representación



VIII.7. Procedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración

En primer lugar, se procedió al montaje sobre campo estéril del circuito de amniofiltración (Fig. 1) que consta de una llave de tres vías, dos conexiones electrocath de 5 cm macho- hembra, una conexión macho-macho, una conexión racor-luer y un filtro de celulosa esterilizado con rayos-gamma con poro de 0.45um. El filtro se fijó a presión en el dispositivo mediante las conexiones.

Como medio antiséptico, el transductor se hallaba inmerso en una solución esporicida (dilución al 4.5% de Instrunet[®]).

La pared abdominal se asepsizó en dos fases: primero con solución de clorhexidina y después con alcohol de 96°.

Previa identificación del punto de punción mediante ecografía, se realizó la punción bajo control ecográfico continuo hasta alcanzar la cavidad amniótica; procediendo después a la extracción del mandril y a la aspiración de la primera fracción de líquido amniótico (1cc), mediante una jeringa de insulina, que se desechó posteriormente en todos los casos. Acto seguido se conectó el circuito de amniofiltración. Se colocó una jeringa a la conexión (A); mediante ajuste de las llaves 1 y 2 del circuito; se aspiró una fracción de líquido a través de la parte del circuito libre de filtro hasta vaciar el circuito de aire. Esta vía permitió también obtener muestras de líquido no filtrado en el caso de que fuera necesario. Una vez llenada esta vía con líquido amniótico, se

ajustaron las llaves 1 y 3 para dejar libre la segunda parte del circuito; se introdujo una jeringa en la conexión B y se aspiraron 10 ml de líquido amniótico. Mediante ajuste de las llaves 3 y 2 se dejó libre el filtro. El líquido contenido en la jeringa se inyectó a través del filtro, expulsando el aire contenido en el mismo a través de la conexión A en la jeringa. Una vez vaciado el aire, mediante ajuste de las llaves 1 y 2 se reinstiló el líquido filtrado en la cavidad amniótica. En los filtrados sucesivos se omitieron los pasos destinados a vaciar el aire del circuito. Directamente se ajustaron las llaves para dejar libre la parte del circuito y se aspiraron 10 ml de líquido amniótico en la jeringa. Mediante ajuste de las llaves se dejó libre el filtro y el circuito de reinstilación. El líquido contenido en la jeringa se inyectó a través del filtro devolviéndolo directamente en la cavidad amniótica. A continuación, la figura 10 muestra las fases del procedimiento de amniofiltración de forma gráfica

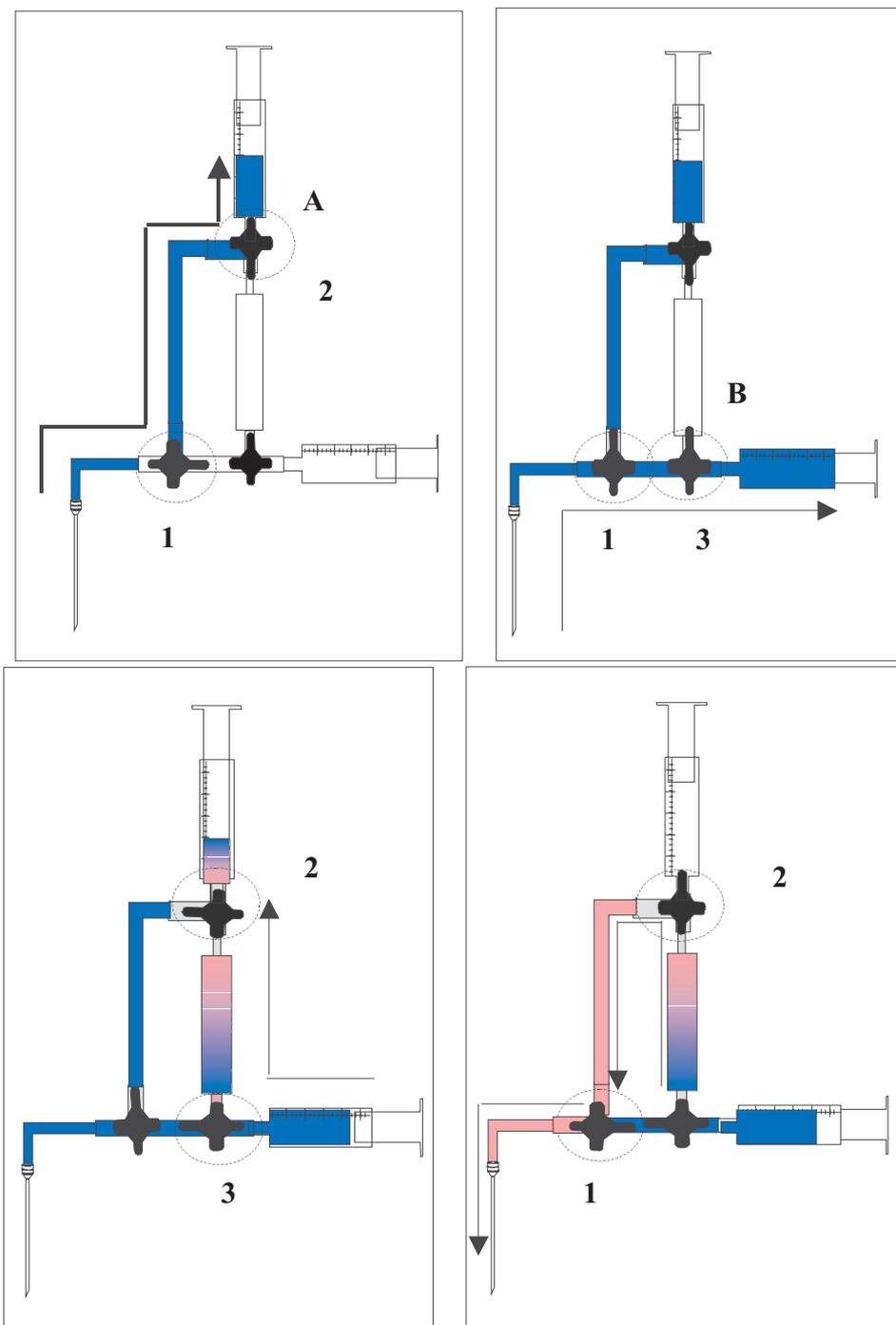


Figura 10. Proceso de amniocentesis

Las siguientes gráficas representan el proceso de amniofiltración paso a paso.



VIII.8. Procesamiento de las muestras

Las células atrapadas en el sistema de filtración se recuperaron mediante un lavado con 5 mililitros de medio de cultivo. Los cultivos se realizaron mediante el método IN SITU en el que los inóculos de líquido amniótico se cultivan directamente sobre cubreobjetos dentro de cajas de Petri. A partir de esto se obtienen cultivos primarios, (colonias que se sacrifican y analizan directamente).

Las muestras control fueron centrifugadas, el sobrenadante separado y las células se cultivaron siguiendo el método "en frasco", en el que el líquido amniótico se cultiva en frascos o tubos de cultivo. Una vez obtenido un crecimiento celular adecuado se utiliza tripsina para extraer el material cromosómico para su posterior estudio.

La alfafetoproteína fue analizada en todos los casos así como la acetilcolinesterasa la cual solo se analizó sólo en los casos dónde el múltiplo de la media de la alfafetoproteína determinada en líquido amniótico fue mayor que 2.

VIII.8.1 Seguimiento pospunción.

A todas las pacientes se les realizó un control a las dos semanas, tras haber realizado el procedimiento para evaluar la existencia de síntomas clínicos como el dolor, metrorragia o hidrorrea; o ecográficos: como hematomas y/o oligoamnios, así como la evaluación de la viabilidad fetal. La ecografía para estudio de malformaciones fetales se llevará a cabo según el protocolo, entre las 18 y las 22 semanas de gestación en la unidad de ecografía obstétrica.

Los resultados perinatales se obtuvieron mediante un cuestionario estandarizado que se entregó a la paciente en la visita correspondiente a la ecografía de las 20 semanas. Cuando el cuestionario no se realizaba, se obtuvo la información de la historia clínica o mediante encuesta telefónica.

VIII.9. Revisión y procesamiento de datos

Todos los datos se registraron en tiempo real empleando una base de datos (DBASEIV) para tal efecto. El análisis estadístico se realizó mediante el cálculo del intervalo de confianza del 95 % empleando la aproximación normal siempre que fué posible así como la ley de Snedecor cuando la muestra no cumplía las condiciones de aplicación de la misma.

IX. Resultados

I X . R e s u l t a d o s

De las 921 pacientes examinadas, el principal parámetro para cariotipo fetal fué la edad materna avanzada (578 pacientes), seguido por antecedentes genéticos (178 pacientes) y marcadores ecográficos (85 pacientes).

El período en que se realizó el procedimiento de biopsia corial fué entre las 9.5 y 13.4 semanas (11.09 en promedio), para amniocentesis precoz con amniofiltración fué entre las 10.0 y 13.6 semanas (12.48 en promedio) y para amniocentesis precoz sin amniofiltración fué entre las 10.5 y 13.6 semanas (12.98 en promedio).

El tiempo empleado en el procedimiento en la biopsia corial fué de 35 a 120 segundos (54.95 en promedio), en amniocentesis precoz con amniofiltración fué de 80 a 665 segundos (259.34 en promedio) y en amniocentesis precoz sin amniofiltración fué de 50 a 120 segundos (66.16 en promedio).

Se presentaron complicaciones en 29 pacientes; 6 de ellas en el procedimiento de biopsia corial, 12 durante el procedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración y 11 durante y tras el procedimiento de amniocentesis precoz sin amniofiltración.

En la biopsia corial se presentaron como complicación por el procedimiento 2 óbitos; 3 pacientes presentaron dolor postpunción y 1 paciente presentó hematoma placentario.

En el grupo analizado por amniocentesis precoz con amniofiltración se observaron 2 pacientes con hematoma placentario, 2 pacientes presentaron ruptura prematura de membranas, 1 paciente presentó membrana resistente, 1 punción seca, 1 hemorragia intraamniótica, 2 con dolor postpunción, 2 con inyección de aire y 1 con fiebre.

En el grupo sometido a amniocentesis precoz sin amniofiltración 1 paciente presentó metrorragia, 1 hematoma placentario, 2 ruptura prematura de membranas, 2 óbitos, 1 con membranas resistentes, 1 punción seca y 2 hemorragia Intraamniótica.

Se presentaron además 6 casos de fallo de cariotipo en la biopsia corial, 2 en la amniocentesis precoz con amniofiltración y 3 en amniocentesis precoz sin amniofiltración.

IX.1. Fallas en el cultivo

El grupo de las pacientes a las que se les realizó amniofiltración presentó un fallo del cultivo en 0.66% de los casos, en biopsia de vellosidad corial 1.93% y en amniocentesis precoz convencional 0.97% de los casos.

IX.2. Complicaciones de los procedimientos

Clasificamos las complicaciones de acuerdo a su gravedad como leves, moderadas o severas para los tres procedimientos, considerando como leves la resistencia de las membranas, que se resuelve generalmente con un empuje firme de la aguja sobre las membranas y se origina debido a que por debajo de la semana 14 de gestación aún no se encuentran completamente adheridas las membranas a la pared uterina y por lo tanto se observa un efecto de tienda de campaña al realizar la punción. Otra complicación leve es la presentación de dolor y la tercera que se presentó fue la entrada de aire al sistema de amniotransfusión. Una complicación moderada que se presentó fue la hemorragia intraamniótica en dos de los procedimientos.

No se presentó complicación grave intraprocedimiento en los tres procedimientos a investigar. En la table 3 se resumen las complicaciones observadas durante el transcurso de la AP.

X.2.1. Complicaciones intraprocedimiento de la amniocentesis precoz

No se presentaron complicaciones severas intraprocedimiento, sin embargo tres pacientes presentaron hemorragia intraamniótica y dos pacientes resistencia de membranas.

Tabla 3. Complicaciones de la amniocentesis precoz.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Ninguna	0
Moderada	Hemorragia intraamniótica	3
Leve	Resistencia de membranas	2

IX.2.2. Complicaciones intraprocedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración

Aunque durante la amniocentesis precoz con amniofiltración no se presentó complicación grave o severa, una paciente presentó una hemorragia intraamniótica como complicación moderada y en dos pacientes se observó resistencia de membranas. Además una paciente reportó dolor a la punción y en dos casos hubo entrada de aire al sistema de filtración. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Complicaciones de la amniocentesis precoz con amniofiltración.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Ninguna	0
Moderada	Hemorragia intraamniótica	1
Leve	Resistencia de membranas	2
	Dolor	1
	Entrada de aire	2

IX.2.3. Complicaciones intraprocedimiento de la biopsia corial

La biopsia corial no presentó complicaciones severas ni moderadas. Solo se presentó dolor en tres pacientes a las cuales se les realizó el procedimiento. Estos resultados se ven reflejados en la table 5

Tabla 5. Complicaciones de la biopsia de vellocidades coriales.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Ninguna	0
Moderada	Ninguna	0
Leve	Dolor	3

IX.2.4. Complicaciones post-procedimiento de la amniocentesis precoz

En la amniocentesis precoz se presentaron tres casos de complicación severa post-procedimiento, de las cuales una fué punción seca, una rotura de membranas y una pérdida fetal. Además se presentó una complicación moderada, (hematoma en el sitio de la punción) y ninguna paciente presentó alguna complicación leve, tal como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Complicaciones de la amniocentesis precoz.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Punción seca	1
	Rotura de membranas	1
	Pérdida fetal	1
Moderada	Hematoma	1
Leve	Ninguna	0

IX.2.5. Complicaciones post-procedimiento de la amniocentesis precoz con amniofiltración

Se presentaron cuatro complicaciones graves posteriores al procedimiento de amniocentesis precoz con amniofiltración, de las cuales dos fueron rotura de membrana y dos de pérdida fetal. Se presentaron dos hematomas placentarios considerados como complicación moderada y no se presentaron complicaciones leves. La tabla 7 muestra estos resultados en forma condensada.

Tabla 7. Complicaciones post-procedimiento de la amniocentesis precoz con amniofiltración.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Pérdida fetal	2
	Rotura de membranas	2
Moderada	Hematoma	2
Leve	Ninguna	0

IX.2.6. Complicaciones post-procedimiento de la biopsia corial

Se presentaron dos complicaciones severas posteriores al procedimiento de la biopsia corial (pérdidas fetales), un hematoma placentario como complicación moderada y no hubo complicación leve, tal y como se observa en la table 8.

Tabla 8. Complicaciones post-procedimiento de la biopsia corial.

Grado	Complicación	Pacientes
Severa	Pérdida fetal	2
Moderada	Hematoma	1
Leve	Ninguna	0

X. Discusión

X I . D i s c u s i ó n

En el presente trabajo se analizó la diferencia entre la amniocentesis temprana con y sin amniofiltración así como la biopsia de vellosidades coriales. Las variantes analizadas fueron el tiempo empleado para la realización de cada técnica, las complicaciones maternas y fetales secundarias al procedimiento, así como el fallo en el cultivo citogenético entre ellas.

En este estudio existió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en el tiempo empleado para la realización de la amniocentesis con amniofiltración comparándola con el tiempo necesario para practicar la biopsia corial y la amniocentesis precoz sin amniofiltración, siendo mayor el tiempo que se requiere para el procedimiento en la amniofiltración (259.34s, 54.95s, 66.16s respectivamente). Estos resultados están acordes con los publicados por Sundberg en el 2003.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al comparar la presentación de las complicaciones presentadas posteriormente a la práctica entre amniocentesis con amniofiltración y amniocentesis precoz ($Tt = 2.58$, 99% de confiabilidad), así como entre el procedimiento de amniocentesis por amniofiltración y la biopsia corial ($Tt = 2.58$, 99% de confiabilidad). Con respecto a los resultados reportados por otros autores se encontró similitud en comparación con lo reportado por Eiben en 1997(c), quien junto con su grupo de colaboradores determinó que la tasa de aborto

después de la semana 28 de gestación en pacientes sometidas a AT y AC no representaba diferencia significativa (2% y 1.3% respectivamente).

En la experiencia de Bombard (1992), Farrán (1993), Yang (1993), Eiben (1993), Gabriel (1993) y Diaz-Vega (1996), la amniocentesis precoz es un procedimiento que puede reunir buenos criterios de seguridad, fiabilidad, ejecutabilidad y es un método alternativo a la BVC y a la AC

Nicolaides y col. (1994) encontraron que la incidencia de muerte intrauterina era más alta en el grupo al que se le practicó la AT en relación con el de BVC. Además mencionaron que la incidencia de pie equinovaro era mayor en el grupo de AT que en el grupo de BVC pero sin diferencia estadística significativa.

Wilson (1997) en un estudio prospectivo, multicéntrico, analizó las malformaciones congénitas de 695 pacientes divididas en dos grupos de mujeres sometidas a amniocentesis temprana y clásica, encontrando una incidencia de anomalías congénitas de 2.4% para AT y de 2.6% para AC. La incidencia de complicaciones musculares tras estos procedimientos fue de 0.9% y 2.4% respectivamente. Concluyendo que la AT es un método diagnóstico alternativo a la AC y BVC. En contraste con los resultados de este reporte, en el presente estudio no se encontraron efectos adversos como malformaciones congénitas y/o musculares posteriores a los análisis efectuados.

Por otra parte, Jauniaux (2000a) menciona que existe mayores complicaciones al practicar la AT y AF, así mismo Winsor (1999) refiere que realizar los procedimientos antes de la semana 13 de gestación puede significar el mayor factor asociado a complicaciones, por lo que ambos autores concluyen que a menor edad gestacional es mayor la tasa de malformaciones congénitas.

Blumfield y col. (1996) encontraron que la salida de líquido o sangrado transvaginal ocurría más frecuentemente en pacientes a los que se les había practicado la AT en comparación con pacientes sometidos a la amniocentesis clásica. Esto significó además un mayor número de pérdidas gestacionales (2.2% vs 0.2%), por lo que concluyeron en su trabajo que la amniocentesis temprana tiene mayor número de complicaciones que la AC. Sin embargo, su incidencia puede variar de 0 (Assel et al., 1992) al 2.7% (Smidt-Jensen et al., 1992).

Cederholm y col. (1997) publicaron los resultados de un estudio en el que participaron 147 mujeres a las cuales se les practicó AT y 174 BVC, encontrando una incidencia de abortos espontáneos de un 6.8% en el grupo de AT y de 1.7% para el grupo de BVC.

Wilson y Shulman efectuaron en 1994 un estudio comparativo en 250 pacientes que dividieron en dos grupos, los cuales fueron estudiados por medio de BVC y AT. A través de esto se observó que existe mayor posibilidad de aborto espontáneo en el grupo de pacientes sometidas a AT que en el grupo de BVC, por lo que

concluyeron que la AT no puede ser tomada en cuenta como una herramienta de diagnóstico prenatal temprano, sugiriendo así que sólo un estudio randomizado de cohorte podrá valorar y determinar la seguridad del procedimiento.

Jauniaux (2000a) hace referencia a que la práctica de técnicas como la AT y BVC deberá abandonarse por su alto índice de complicaciones. Sundberg (2003), quién ha realizado estudios por más de una década sobre amniocentesis temprana con amniofiltración, refiere una alta incidencia de talipe equinovaro, mayor tasa de pérdida gestacional y alto porcentaje de RPM de 4.4% si se realiza la AT antes de la semana 13 comparado con la BVC y AC. Debido a esto, menciona que la práctica de los procedimientos AT y AF antes de la semana 13 deberán discontinuarse, y darle preferencia a la AC

En el presente estudio, la diferencia del fallo de cultivo entre amniocentesis precoz con amniofiltración y amniocentesis precoz sin amniofiltración fué de 0.66% y 0.97% respectivamente con una significancia estadística de $p < 0.05$. Con respecto a la biopsia corial, esta presentó una diferencia de fallo de cultivo de 1.93% en relación con la de amniofiltración de 0.66% con una significancia estadística de $p < 0.001$. No se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) de proporciones de fallo de cultivo entre amniofiltración y amniocentesis precoz ($Tt=2.58$, 99% de confiabilidad) y entre amniofiltración y biopsia corial ($Tt=2.58$, 99% de confiabilidad). Sundberg en el 2003 reportó

resultados similares con los de este estudio.

Sundberg (2003) demostró que la AF mejoraba el número y calidad de las muestras utilizando su sistema de amniofiltración y que es una técnica más rápida y segura para el seguimiento de mosaicismos obtenidos de las BVC, con poco fallo en el cultivo de 0.2% y con un tiempo de reporte citogenético de 10 días en promedio. Con respecto a la calidad cromosómica no encontró que la técnica de AF mejorara las muestras. No encontró diferencias significativas con respecto a pseudomosaicismo, contaminación celular materna, así como aberraciones numéricas y estructurales con respecto a otras técnicas.

Según los resultados de un estudio practicado por el mismo autor en 1997, no existieron diferencias significativas en fallo de cultivo en comparación con las otras dos técnicas. En otro estudio publicado por Nicolaidis en 1994, la tasa de fallo de cultivo entre éstas dos técnicas fue de 2.3% y de 0.5% respectivamente.

Recordando que el objetivo principal del presente estudio fue comparar si la amniocentesis temprana con técnica de amniofiltración era superior a la técnica de amniocentesis temprana sin amniofiltración y a la biopsia de vellosidades coriales. Se debe remarcar la complejidad de la técnica de amniofiltración en la amniocentesis precoz, ya que se requiere personal altamente especializado para su realización y el tiempo empleado en este

procedimiento es mucho mayor con respecto al de los otros dos. En nuestro trabajo de investigación, la técnica de filtración difirió de la de Sundberg (2003), ya que consistió en obtener las células durante la reinstilación de LA a la cavidad amniótica, no durante la obtención del líquido amniótico, sin embargo no se encontraron diferencias en los resultados citogenéticos, calidad de células obtenidas así como el tiempo empleado en la realización del procedimiento.

Se encontró que no existen ventajas sobre las otras dos técnicas y que la mayoría de los autores concuerdan en que existen mayores complicaciones cuando estas técnicas se realizan a menor edad gestacional (Jauniaux et al., 2000a, Nicolaidis et al., 1994, Sundberg et al., 2003).

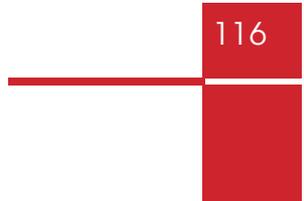
A la fecha, no existen estudios randomizados para la amniocentesis entre las semanas 13-15 que demuestren claramente la efectividad de la AT y AF incluyendo los resultados del presente trabajo, por lo que aún no se debe considerar como procedimiento seguro como la AC y BVC.

Es importante mencionar que en la actualidad se cuenta con técnicas analíticas a nivel molecular tales como hibridación in situ por fluorescencia (FISH) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR), las cuales brindan un resultado citogenético rápido y seguro de la mayoría de las anomalías cromosómicas (Adinolfi M, 2001).

C O N C L U S I Ó N

Al iniciar el presente estudio y en base a lo reportado en la literatura se decidió comparar el método de amniocentesis temprana con técnica de amniofiltración, el cual se consideró como más prometedor en relación a otras prácticas para el diagnóstico prenatal temprano como la biopsia de vellocidades coriales y la amniocentesis precoz sin amniofiltración. En los estudios existentes se ha demostrado que al practicar la amniofiltración, el índice de fallo de cultivo es menor además de que es posible realizarla en etapas muy tempranas de la gestación sin necesidad de extraer grandes cantidades de líquido amniótico. Esto permite obtener un resultado en menor tiempo, lo que facilita una decisión obstétrica adecuada. (Los resultados de este trabajo muestran que la práctica de amniofiltración es más compleja en relación con otros métodos de diagnóstico prenatal y se requiere mayor tiempo para su realización. Considerando las complicaciones que presentaron las pacientes posteriormente al procedimiento así como el porcentaje de fallo de cultivo, ninguna diferencia estadística significativa fue establecida entre los tres métodos estudiados.

Actualmente y debido a que la tecnología ha permitido el desarrollo importante de técnicas como QF-PCR y FISH que facilitan un más rápido y deseable diagnóstico citogenético, la práctica de una amniocentesis temprana con la técnica de amniofiltración debe de considerarse solo como un método alternativo para el diagnóstico prenatal temprano de enfermedades cromosómicas.



XII. Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOG. Amniocentesis and chorionic villus sampling review 1999. ACOG Committee Opinion No. 223. Washington, DC: ACOG; October 1999.
- Adinolfi M, Sherlock J. Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR. *Lancet* 358;1030-1:2001
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential Cell Biology*. Garland, 1998. p. 198-209.
- Alfirevic Z. Early amniocentesis versus transabdominal chorion villus sampling for prenatal diagnosis. 6: *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD000077
- Antonarakis SE. BACing up the promises. *Nat Genet* 2001;27:230-2
- Assel BG, Lewis SM, Dickerman LH, Park VM, Jassani MN. Single-operator comparison of early amniocentesis and mid-second trimester amniocentesis. *Obstet gynecol* 79:940, 1992
- Aviram Goldring A, Daniely M, Chaky R, Chaki R, Lipitz S, Barkai G. Advanced FISH with directly labeled X, Y and 18 DNA probes as a tool for rapid prenatal diagnosis. *J Reprod Med* 44:497-503, 1999
- Baird PA, Lee ML, Sadovnick AD. Population-based study of long-term outcomes after amniocentesis. *Lancet* 344:1134-1136, 1994
- Bakharev VA, Karetnikova NA, Polesterov IUA, Lisova LP, Lantovskii IuR. Value of early amniocentesis in the first diagnosis in the first trimester of pregnancy. *Akusherstvo I Ginekologiya* 4:9-10, 1991

- Barch MJ. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, 2ed, Raven Press New York, 1991.
- Benacerraf BR, Greene MF, Salzman DH. Early amniocentesis for prenatal cytogenetic evaluation. *Radiology* 1988;169:709-10
- Benn PA, Gainey A, Ingardia CJ, Rodis JF, Egan JFX. Second trimester maternal serum analytes in triploid pregnancies: correlation with phenotype and sex chromosome complement. *Prenat Diagn* 2001;21:680-6
- Benn PA. Advances in prenatal screening for Down syndrome: I General principles and second trimester testing. *Clin Chim Acta* 2002;323:1-6
- Benn PA. Advances in prenatal screening for Down syndrome: II. First Trimester testing, integrated testing and future direction. *Clin Chim Acta* 2002;324:1-11
- Bennett RL. Getting the roots: recording family tree. The practical guide to the genetic family history New York: Wiley-Liss, Inc.; 1999. P 38-67
- Bensahel H, Del Monte A, Hjelmstedt A, Bjerkreim I, Wientroub S, Matasovic T. Congenital dislocation of knee. *J Pediatr Orthop* 1989; 9:174-7
- Berghella V, Wapner RJ, Yang-Fent T, Mohoney MJ. Prenatal confirmation of true fetal trisomy 22 mosaicism by fetal skin biopsy following normal fetal blood sampling. *Prenat Diagn* 1998;18:384-9

- Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3279-83
- Bombard T, Rigdon DT. Prospective pilot evaluation of early (11-14 weeks' gestation) amniocentesis in 75 patients. *Military Med* 1992; 157:339-341.
- Bonilla MF. Amniocentesis en el diagnóstico prenatal de las alteraciones congénitas, en diagnóstico prenatal de las malformaciones fetales: ecografía, fetoscopia, alfafetoproteína y líquido amniótico. *Barcelona Jims*, 1983: 329-35
- Brace R. Fisiología de la regulación del líquido amniótico. *Clin obstet gynecol* 1997;40:261-268.
- Bradley LA, Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE. Levels of unconjugated estriol and other maternal serum markers in pregnancies with Smith-Lemli-Optiz (RSH) syndrome fetuses. *Am J Med Genet* 1999;82:355-8.
- Brambati B, Tului I, Cislighi C, Alberti E. First 10000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat diagn* 1998;18:255-266.
- Brambati B, Tului L, Camurri L. Early second trimester (13-20 weeks) transabdominal chorionic villus sampling (TA-VCS): a safe and alternative method for both high and low risk populations. *Prenat diag* 2002; 22:907-913.

- Bravo RR, Shulman LP, Phillips OP, Greengood C, Materns PR. Transplacental needle passage in early amniocentesis and pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 1995; 86:437-440.
- Brumfield CG, Lin S, Conner W, Cospers P, Davis RO, Owen J. pregnancy outcome following genetic amniocentesis at 11-14 weeks' gestation. *Obstet Gynecol* 1996; 88:114-118.
- Byrne D, Azar G, Nicolaides K. Why cell culture is successful after early amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* 1991; 6: 84-6.
- Byrne DL, Nicolaides KH: Amniotic fluid temperature change during first trimester amniocentesis. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101; 340-1
- Byrne DL, Penna L, Marks K. First trimester amniocentesis: technical, cytogenetic and pregnancy outcome of 104 consecutive procedures. *Br J Obstet Gynecol* 1995; 102:220-3.
- Byrne J, Northeved A. A new method for transabdominal amniocentesis. *AM J Obstet Gynecol* 1991; 114;84.
- Calhoun BC, Brehm W, Bombard AT. Early genetic amniocentesis and its relation to respiratory difficulties in pediatric patients: a report of findings in patients and matched controls 3-5 years post-procedure. *Prenat diag* 1994; 14;209-212.
- Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group. Multicenter randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. First report, *Lancet*, 1989; 1: 1-6.

- Canick JA, Palomaki GE, Osthanondt R. Prenatal screening for trisomy 18 in the second trimester. *Prenat Diagn* 1990;10:546-8
- Cederholm M, Axelsson O, Sjoden PO. Women's knowledge and psychological reactions before undergoing an invasive procedure for prenatal karyotyping. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 14:267-72.
- Cederholm M, Axelsson O. A prospective comparative study on transabdominal chorionic villus sampling and amniocentesis performed at 10-13 week's gestation. *Prenat diagn* 1997; 17: 311-17.
- Crandall BF, Kulch P, Tabsh K. Risk assessment of amniocentesis between 11 and 15 weeks: comparison to later amniocentesis controls. *Prenat diagn* 1994; 14: 913-9.
- Crandon AJ, Peel KR. Amniocentesis with and without ultrasound guidance. *Br J Obstet Gynecol* 1979;86:1-3.
- Crane JP, Kota MM. Genetic amniocentesis: impact of placental position upon the risk of pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150:813.
- Cuckle HS, van Lith JM. Appropriate biochemical parameters in first trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1999;19:505-12
- Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptual vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5

- Daffos F, Capella-Pavlosky M, Forestier F. A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results in fifty-three cases. *Am J Obstet gynecol* 1983; 146:985-987.
- Daniel A, Ng A, Kuah KB, Reihá S, Malafiej P. A study of early amniocentesis for prenatal cytogenetics diagnosis. *Prenat diagn* 1998; 18;21-8.
- Dálton ME, DeCherney AH. Currents concepts: prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 1993;328:114-120
- De Andrade M, Barnholtz JS, Amos Ci, I. Lochmiller C, Scott A, Risman M, Hecht JT. Segregation analysis of idiopathic talipes equinovarus in texan population. *Am J Med Genet* 1998; 79:97-102.
- Delisle MF, Wilson RD. First trimester prenatal diagnosis: amniocentesis. *Semin perinatol* 1999; 23:414-423.
- DeVore GR. The genetic sonogram: its use in the detection of chromosomal abnormalities in fetuses of women of advanced maternal age. *Prenat Diagn* 2001;21:40-5.
- Dexeus S. *El riesgo de nacer; el desafío del diagnóstico prenatal*. Barcelona: Labor, 1989: 450
- Diaz-Vega M, De la Cueva P, Leal C, Aisa F. Early amniocentesis at 10-12 week´s gestation. *Prenat Diagn* 1996; 16; 307-312.
- Djalali M, Barbi G, Kennerknecht I, Terinde R. Introduction of early amniocentesis to routine prenatal diagnosis. *Prenat diagn* 1992; 12; 661.

- Eiben B, Goebel R, Hansen S, Hammans W. Early amniocentesis- a cytogenetic evaluation of over 1500 cases. *Prenat diagn* 1994; 146:487-501.
- Eiben B, Goebel R, Rutt G. Early amniocentésis between the 12th-14th web of pregnancy. Clinical experiences (1,100 cases). *Gebutrshilfe und frauenheilkunde (German Journal)*, 1993; 53:554-8.
- Eiben B, Hammans W, Goebel R. Chorionic villus sampling versus early amniocentesis. *Lancet* 1997a; 350;1253-4.
- Eiben B, Hammans W, Trawicki W, Goebel R. Early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 1997b; 17; 311-317.
- Eiben B, Hammans W, Hansen S. On the complication risk of early amniocentesis versus standar amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* 1997c; 12:140-4.
- Elejalde BR, De Elejalde MM, Acuna JM, Thelen D, Trujillo C, Karrmann M. Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility, risks, complication and use in early genetic prenatal diagnosis. *Am J med Genet* 1990; 35:188.
- Emery EAH. Antenatal diagnosis of genetic disease. *Mod trends Hum Genet* 1970; 1:267.
- Evans MI, A Drugan, Koppitc III, et al. Genetic diagnosis in the first trimester: the norm for the 1990s. *Am J Obstet Gyencol* 1989; 160;1332.

- Farran I, Sánchez-Durán MA, Mediano C, Gasser I. Amniofiltración. Prog. Obstet. Ginecol. 1997;40 Supp 1.
- Farrán I, Pla F, Mediano C, Canet Y, Carreras E, M. de la Riva A, Cabero LI. Amniocentesis precoz, resultados en 206 casos con seguimiento neonatal Prog Diag Pren 1993; 5:73-78.
- Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, Mackenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56- 66 days' gestation. Lancet 1991a; 337;762-763.
- Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P et al. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation. Lancet 1991b; 338;51.
- Fogarty PP. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. Br J Obstet Gynecol 1992; 99:530.
- Fonseca ML, Silva E, Pinto M, Teles O, MR et al. Amniofiltração no 1º trimestre de gravidez- Análise citogenética das células fetais Prog Diag. Pren 1992; 4; 189.
- Foulon W, Naessens A, de Catte L. Detection of congenital toxoplasmosis by chorionic villus sampling and early amniocentesis. Am J Obstet Gynecol 1990; 163:1511-3.
- Frydman R, Pons JC, Borghi E, Selva J, Olivennes F, O'Donovan F, Fernandez H, LeLorc'h M. Per-urethral transvesical first-trimester amniocentesis. Eur J Obstet, Gynecol, Reprod Biol 1993; 48: 99-101.

- Fuchs F, Riis R. Antenatal sex determination. *Nature* 1956, 177:330.
- Fuente-Pérez P, Bajo Arenas JM, Olaizola Lloido JL. Amniocentesis en el diagnóstico prenatal de malformaciones congénitas. En: Diagnóstico prenatal de malformaciones congénitas. Madrid: Interamericana, 1984: 25-39.
- Gabriel R, Harika G, Carre-Pigeon F, Quereux C, Wahl P. Amniocentesis to study the fetal karyotype before 16 weeks of amenorrhea. Prospective study comparing it with conventional amniocentesis [frech]. *J Gynecol Obstet Biol Repod* 1993; 22:169-171.
- García-Álvarez F, Bello ML. Letter. *J Pediatr orthop* 2002; 22:411-412.
- Gardella C, Thoulon JM, Servajean V, Domenichini Y, Charvet F. Early amniocentesis: accidents and incidents. Study of series of 681 single pregnancies. *Revue Francaise de Gynecologie et d'Obstetrique* 1986; 81:677-81.
- Germain A. Polihidramnios y Oligoamnios, *Obstetricia* 1992; Public Técnicas Mediterráneo, Santiago Chile.
- Gersen SL, Keagle M.B., *The principles of clinical cytogenetics*. Humana Press Totowa, New Jersey, 1999.
- Godmillow L, Weiner S, Dunn LK. Genetic amniocentesis performed between 12 and 14 weeks of gestation. *Am J Hum Genet* 1987; 41:818.
- Greenough A, Yuksel B, Naik S, Cheeseman P, Nicolaidis KH. First trimester invasive procedures: effects on symptom status and lung volume in very young children. *Pedriatr Pulmonol* 1997a; 24: 415-22.

- Greenough A, Yuksel B, Naik S. Invasive antenatal procedures and requirement for neonatal intensive care unit admission. *Eur J Pediatr* 1997b; 156:550-2.
- Gregg AR, Simpson JL. Genetic screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2002;29:329-40
- Guizar J. Genética clínica diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 2ed. *El Manual Moderno*; 1994. p. 611-39.
- Hackett GA, Smith JH, Rebello MT, Gray CT, Rooney DE, Beard RW, Loeffler FE, Coleman DV.. Early amniocentesis at 11-14 weeks' gestation for the diagnosis of fetal chromosomal abnormality. A clinical evaluation. *Prenat Diagn*, 1991; 11;311-315.
- Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, 1. Cunningham, GC, Lustig, LS, Boyd, PA. Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum markers for screening. *N Engl J Med* 1994;330:1114-8.
- Haga N, Nikamura S, Sakaguchi, Hune S, Brookhyser K. Congenital dislocation of the knee reduced spontaneously or with minimal treatment. *J Pediatr Orthop* 1997; 17:59-62.
- Hahn S, Holzgreve W, editors. *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood New Developments for a New Millenium*, Karger, 2001. USA
- Hahnemann JM, Vejerslev LO. European collaborative research on mosaicism in CVS (eucromic) fetal and extrafetal cell lineages in

192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am. J. Med. Genet.* 70 (1997) 179-187.

Hanson FW, Tennant F, Hune S, Hune S, Peterson AG. Early amniocentesis: outcome, risks, and technical problems at less than or equal to 12.8 weeks. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1707-1711.

Hanson FW, Happ RL, Tennat FR, Hune S, Brookhyser K. Ultrasonography-guided early amniocentesis in singleton pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1376.

Hanson FW, Zorn EM, Tennat FR. Amniocentesis before 15 week's gestation: outcome, risks and technical problems. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:1524.

Harrison R, Campbell S, Craft I Risks of fetomaternal hemorrhage resulting from amniocentesis with and without ultrasound placental localization. *Obstet Gynecol* 1975;46:389-91

Harrison R, Campbell S, Craft I. Risk of fetomaternal hemorrhage resulting from amniocentesis with and without placental localization. *Obstet Gynecol* 1975; 46:389.

Henrion R, Papa F, Rouvillos JL, Aubry JP. Early amniocentesis in twin pregnancies. *Press med* 1978; 7:4119-21.

Henrion R, Papa F, Rouvillos JL, Henrion-Geant E. Early amniocentesis, 1061 pictures and 1000 pregnancies. *J Gynecol Obstet Biol reprod* 1979; 8:603-11.

Henry GP, WA Miller: Early Amniocentesis. *J Reprod Med* 37;396, 1992

- Hess LW, Anderson RL, Goldus MS. Significance of opaque discolored amniotic fluid at second trimester amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1986; 67:44.
- Hickok DE, Mill M. Percutaneous umbilical blood sampling: results from a multicenter collaborative registry. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1614-8.
- Himes P. Early pregnancy prenatal diagnosis testing: risk associated with chorionic villus sampling and early amniocentesis and screening options. *J Perinat Neonat Nurs* 1999; 13:1-13.
- Hislop A, Fairweather DV. Early amniocentesis. *J Reprod Med* 1992; 37:396.
- Hsieh FJ, Shyu MK, Sheu BC, Lin SP, Chen R, Huang, FY. Limb defects after chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol*.1995; 85: 84-88.
- Hsu L, Kaffe S, Jenkins E, Alonso L, Benn P, David K, Hirschhorn K, Lieber E, Shanske A, Shapiro L, Schutta E, Warburton D. Proposed Guidelines for Diagnosis of Chromosome Mosaicism in Amniocytes Based on Data Derived from Chromosome Mosaicism and Pseudomosaicism Studies. *Prenat Diagn* 1992;12:555-573.
- Hsu LYF, Benn PA. Revised Guidelines for the Diagnosis of Mosaicism in Amniocytes. *Prenat Diagn* 1999;19:1081-90.

- Jauniaux E, Pahal GS, Rodeck CH. GAT invasive procedure to use in early pregnancy? Best pract res clin Obstet gynecol 2000(a); 14:651-62.
- Jauniaux E, Pahal GS, Rodeck CH. What invasive procedure to use in early pregnancy? Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000 (b);14:651-662
- Jeanty P, Rodesch F, Romero R. How to improve your amniocentesis technique. Am J Obstet Gynecol 146:593-596
- Johnson JM, Wilson RD, Singer J, Winsor E, Harman C, Armson BA, Benzie R. The technical factors in early amniocentesis predict adverse outcome. Results of the Canadian early versus mid-trimester amniocentesis trial. Prenat diagn 1999; 19:732-738.
- Johnson JM, Wilson RD, Winsor E, Harman C. The early amniocentesis study: a randomized clinical trial of early amniocentesis versus mid-trimester amniocentesis. Fetal Diagn Ther 1996; 11:85-93.
- Jorgensen FS, Bang J, Lind A-M. Genetic amniocentesis at 7-14 weeks of gestation. Prenat diagn 1992; 12:277.
- Kaback MM, Lim-Stelle J, Dabholkar D, Brown D, Levy N, Zeiger K. Tay-Sachs disease-carrier screening, prenatal diagnosis and the molecular era. JAMA 1993; 270:2307-15.
- Kackett GA, Smith JH, Rebello JA. Early amniocentesis at 11-14 weeks gestation for the diagnosis of fetal chromosomal abnormality-a clinical evaluation. Prenat Diagn 1991; 162:1376.

- Karp LE, Rothwell R, Conrad SH, Hoehn HW, Hickok DE. Ultrasonographic placental localization and bloody taps in midtrimester amniocentesis for prenatal genetic diagnosis. *Obstet Gynecol* 1997; 50:589.
- Kennerknecht I, Kramer S, Grab D et al. Evaluation of amniotic fluid cell filtration: an experimental approach to early amniocentesis. *Prenat Diagn* 1993; 13:247-55.
- Kuliev A, Jackson L, Froster U, Brambati B, Simpson JL, Verlinsky Y, Ginsberg N. Fetus-placenta-newborn: chorionic villus sampling safety: report of World Health Organization/EURO meeting in association with the Seventh International Conference on Early prenatal diagnosis of genetic diseases, Tel-Aviv, Israel, May 21, 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1996, 174:807- 811
- Lambert-Messerlian GM, Saller Jr DN, Tumber MB, French CA, Peterson CJ, Canick. Second trimester maternal serum inhibin A levels in fetal trisomy 18 and Turner syndrome with and without hydrops. *Prenatal Diagn* 1998;18:1061-7
- Langman J. *Medical Embryology*, 4th Edition 1981, Baltimore: Williams and Wilkins, 86.
- Ledbetter DH; Martin AO, Verlinsky Y. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:495-501.

- Lele AS, Carmody PJ, Hurd Me, O'Leary JA. Fetomaternal bleeding following diagnostic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1982; 60:60.
- Lenke RR, Cyr DR, Mack LA. Midtrimester genetic amniocentesis with simultaneous ultrasound guidance. *J Clin Ultrasound* 1985;13:371-4
- Lindner C, Huneke B, Masson S. Early amniocentesis for cytogenetic diagnosis [german]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 1990; 50:954-8.
- Lynch L, Doran TA, Benzie RJ. Amniocentesis, skin biopsy and umbilical cord blood sampling in the prenatal diagnosis of genetic disorders: In Reece EA, Hobbins JC, Mahoney MJ (eds). *Medicine of the fetus and mother*, Philadelphia, JB Lippincort, 1992, pp 641-652.
- McGowan KW, Blakemore KJ, Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1991; 3: 221-9.
- Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN et al. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:886-94
- Milner AD, Hoskyns EW, Hopkin LE. The effects of mid-trimester amniocentesis on lung funtion in the neonatal period. *Eur J Pediatr* 1992; 151; 458-460.

- Milunsky A. Genetic Disorders and the fetus, editor. Diagnosis, Prevention, and Treatment. 4ed, Johns Hopkins University Press, 1998.
- Miny P, Tercanli S, Holzgreve W. Developments in laboratory techniques for prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14:161-168.
- Moore T. Valoración clínica del líquido amniótico. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40:281-290.
- Moore, KL., Persaud TVN. , *Embriología Clínica* 6ª edición 1999, México. Interamericana.
- MRC Vitamin study research group. Prevention of neural tube defects: results of the medical research council vitamin study. *Lancet* 1991;338:131-7
- Murken JA, Stengel-Rutkowski S, Schwinger E. In. *Prenatal diagnosis. Proceedings, 3rd European Conference on prenatal diagnosis of genetic disorders.* Stuttgart, Ferdinand Enke, 1979, p 132.
- Nassar A, Martin D, González-Quintero V, Gomez-Marin O, Salman F, Gutierrez A, O'Sullivan MJ. Genetic amniocentesis complications: is the incidence over-rated? *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:186.
- Nevin J, Nevin NC, Dornan JC, Sim D, Armstrong MJ. Early amniocentesis: experience of 222 consecutive patients, 1987-1988. *Prenat Diag* 1990; 10:79.

- Nicolini U, Rodeck CH. Fetal blood and tissue sampling. In: BrockDJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith MA, editors. Prenatal diagnosis and screening London: Churchill Livingstone; 1992.p. 39-51
- Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur, C., & Marks, K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosome defects in first trimester of pregnancy. BML 1992;304:867-9
- Nicolaides KH, Brizot ML, et al. Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation. Lancet 1994; 344:435-439.
- Nicolaides KH, Brizot ML, Patel F. Comparison of chorion villus sampling and early amniocentesis for karyotyping in 1492 singleton pregnancies. Fetal Daiag Ther 1996; 11: 9-15.
- Nicolaides KH, Sebire NJ, Snijders RJM. Incresed nuchal translucency with normal karyotipe. In: The 11-14 week scan: the diagnosis of fetal abnormalities New York: Parthenon Publisih Group. 1999: 67-3
- Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;21:313-2
- Niebauer JJ, King DE. Congenital dislocation of the knee. J Bone Joint Surg 1960; 42:207-25.
- Nikkila A, Valentin L, Thelin A , Jorgensen C. Early amniocentesis and congenital foot deformities. Fetal Diagn Ther 2002; 17:129-32.
- Nuss S, Brebaum D, Ground GC. Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique. Human Genet 1994;93:121-4.

- Nyberg DA, Luthy DA, Cheng EY, Sheley RC, Resta RG, Williams MA. Role of prenatal ultrasound in women with positive screen form Down syndrome based on maternal serum markers. *AM J Obstet Gynecol* 1995;173:1030-5
- Nyberg DA, Souter VL, El-Bastawissi A. Et al. Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med* 2001;20:1053-63
- Orlandi F, Damiani G, Hallahan W, Krantz DA, Macri JN. First-trimester screening for fetal aneuploidy: biochemistry and nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997;10:381-6
- Pandya PP, Golberg H, Walton B, Walton B, Riddle A, Shelley S, Snijders RJ, Nicolaides KH. The implementation of first-trimester scanning at 10-13 weeks' gestation and the measurement of fetal nuchal translucency thickness in two maternity wards. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995;5:50-5
- Penso CA, Sandstrom MM, Garber MF, Ladoulis, JM Stryker, and BB Benacerraf. Early amniocentésis: report of 407 cases with neonatal follow-up. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 1032-1036.
- Pérez-Sánchez A, Donoso Siña En: *Obstetricia* 1992; Public. Técnicas Mediterráneo, Santiago - Chile.
- Pijpers H, Jahoda MGJ, Vosters RPL. Genetic amniocentesis in twin pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1988; 95:323-6.

- Rebello MT, Abast A, Nicolaides K, Abas A, Nicolaides K, Coleman DV. Maternal contamination of amniotic fluid demonstrated by DNA Analysis. *Prenat diagn* 1994; 14:109-112.
- Rebello MT, Gray CT, Ronney DE. Cytogenetics studies of amniotic fluid taken before the 15th week of pregnancy for earlier prenatal diagnosis: a report of 114 consecutive cases. *Prenat Diagn* 1991; 11;35.
- Reece EA. Early and midtrimester genetic amniocenteses. Safety and outcomes. *Obstet Gynecol Clin* 1997; 24:1.
- Romero R, Jeanty P, Reece EA, Grannum P , Bracken M, et al. Sonographically monitored amniocentesis to decrease intraoperative complications. *Obstet Gynecol* 1985; 65:426-30.
- Rooney DE, . *Human Cytogenetics constitutional analysis*, 3ed, Oxford University Press, 2001
- Rooney DE, Maclachlan N, Smith J et al. Early amniocentésis: a cytogenetic evaluation. *BJM* 1989; 299;25.
- Rousseau O, Boulot P, Efort G et al. Amniocentesis before 15 weeks´ gestation: technical aspects and obstetrics risk. *Eur J Obstet Reprod Bio* 1995; 58:127-130.
- Rudigoz DC, Le Maout G, Delignette M. Chorionic Villi sampling. Amniocentesis. Condocentesis. *Revue Francaise de Gynecologie et d'Obstetrique* 1990; 85:97-100.

- Salamanca F. Citogenética Humana. 1ed. Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 83-91.
- Salvensen DR, Goble O. Early amniocentesis and fetal nuchal translucency in women requesting karyotyping for advanced maternal age. *Prenat diag* 1995; 15: 971-4.
- Serr DM, Sachs L, Danon M. Diagnosis of sex before birth using cell from amniotic fluid. *Bull Res Council* 1st 1955; 58:137,1955
- Shulman LP, Elias S, Philips OP, Grevengood C, Dungan JS, Simpson JL. Amniocentesis performed at 14 weeks' gestation or earlier: comparison with first-trimester transabdominal chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol* 1994; 83:543-8.
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, Rosella f, Terzoli GL, Ferrari M., Efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet* 1983;67: 349-357.
- Smidt-Jensen S, Permin M, PhilipJ, Philip J, Lundsteen C. Randomized comparison of transabdominal and transcervical chorionic villus sampling and amniocentesis. *Lancet* 1992; 340:1237.
- Snijders RJM, Noble P, Sebire N, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 and maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks gestation. *Lancet* 1998;352:343-6

- Spencer JW, Cox DN. Comparison of chorionic villi sampling and amniocentesis: acceptability of procedure and maternal attachment to pregnancy. *Obstet gynecol* 1988;72: 714-8.
- Steele MW, Berg WR. Chromosome analysis of human amniotic cells. *Lancet* 1966; 1:383.
- Stripparo L, Buscaglia M, Longatti L. Genetic amniocentesis: 505 cases performed before the sixteenth week of gestation. *Prenat Diagn* 1990; 10:359.
- Sundberg K, Bang J, Brocks V, Jensen FR, Smidt-Jensen S Early sonographically guided amniocentesis with filtration technique: follow-up on 249 procedures. *J Ultrasound Med* 1995a; 14:585-590.
- Sundberg K, Jorgensen FS, Tabor A, Bang J. Experience with early amniocentesis. *J Perinat Med* 1995b; 23:149-158.
- Sundberg K, Lundsteen C, Philip J. Early amniocentesis for further investigation of mosaicism diagnosed by chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 1996; 16:1121-7.
- Sundberg K, Smidt-Jensen S, Lundsteen C. Filtration and recirculation of early amniotic fluid. Evaluation of cell cultures from 100 diagnostic cases. 1993; 3:1101-1110.
- Sundberg K, Smidt-Jensen S, Philip J. Amniocentesis with increased cell yield, obtained by filtration and reinjection of the amniotic fluid. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1991; 1:91-94.

- Sundberg K, Bang J, Smidt-Jensen S, Brocks V, Lundsteen C, Parner J, Keiding N, Philip J. Randomized study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Lancet* 1997; 350:697-703.
- Sundberg K. Aspects of early amniocentesis. A cytogenetic evaluation of the filter technique. *Dan Med Bull* 2003;50:1-14.
- Tabor A, Philip J, Madsen M. Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986; 1:287.
- Tharmaratnan S, Sadek S, Steele K. Early amniocentesis: effect of removing a reduced volume of amniotic fluid on pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 1998; 18:773-778.
- Thayer B, Braddock B, Spitzer K. Clinical and laboratory experience with early amniocentesis. *Birth Defects* 1990; 26:58.
- The NICHD National Registry for amniocentesis Study Group. Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. *JAMA* 1976; 236: 1471-1476.
- Thompson PJ, Nicolaides KH. Lung function following first-trimester amniocentesis or chorion villus sampling. *Fetal Diag Ther* 1991; 6:148-152.
- Torrents M, Cos T, Muñoz A. Amniofiltración una nueva técnica de diagnóstico prenatal. Resultados preliminares. *Prog Diagn Pren* 1994; 6; 299-304.

Tredwell SA, Wilson D, Wilmink M, Wilmink MA. Review of the defects of early amniocentesis on foot deformity in the neonate. *J Pediatr Orthop* 2001; 21:636-641.

Van Opstal D, van den Berg C, Robert-Jan H et al. Follow up investigation in uncultured amniotic fluid cells after uncertain cytogenetic results. *Prenat diag* 2001; 21:75-80.

Vega H. Prenatal diagnosis by chorionic villus. *Ginec Obst Mex* 1991; 59: 211-214.

Ville YG, Nicolaides KH, Campbell S. Prenatal diagnosis of fetal malformations by ultrasound. In: *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatment*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1998:p.750-811

Viscarello RR, Gollin YG, Hobbins JC. Alternate methods of first-trimester diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1991; 18:875-90.

Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T. Maternal serum screening for Down syndrome in early pregnancy. *BJM* 1988;297:883-7

Wald NJ, Densem JW, George L, Muttukrishna S, Knight P G. Prenatal screening for Down ´ syndrome using inhibin A as a serum marker. *Prenat Diagn* 1996;16:143-52

Wapner R, Thorn E, Simpson J, Pergament E, Silver,R, Filkins K. First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N Engl J Med* 2003;349:1405-11

- Watchel E, Gordon A, Olsen E. Cytology of amniotic fluid, Br J Obstet. Gynecol., 1969; 85: 1-4.
- Wegner RD. Cytogenetic reliability of CVS: the German collaborative study in comparison to other multi-center studies. In: Early prenatal diagnostics. Hamburg. 1995
- Wenstrom KD, Desday R, Owen J. Comparison of multiple marker screening with amniocentesis for the detection of fetal aneuploidy in women \geq 35 years old. Am J Obstet Gynecol 1995;173:1287-92.
- Wilson RD, Johnson J, Windrim R. The early amniocentesis study: a randomized clinical trial of early amniocentesis and midtrimester amniocentesis II. Evaluation of procedure details and neonatal congenital anomalies. Fetal Diagn Therap 1997; 12:97-101.
- Wilson RD. Early amniocentesis: a clinical review. Prenat Diagn 1995; 15:1259-1273.
- Winsor EJ, Tomkins DJ, Kalousek D, Farrell S, Wyatt P, Fan YS, Carter R, Wang H, Dallaire L, Eydoux P, Welch JP, Dawson A, Lin JC, Singer J, Johnson J, Wilson RD. Cytogenetic aspects of the Canadian early and mid-trimester amniotic fluid trial (CEMAT). Prenat Diagn 1999; 19:620-627.
- Witters I, Moerman P, Assche A, Van Assche A, Fryns JP. Physical and psychomotor development of 1779 children born after second trimester amniocentesis for maternal serum positive triple test

screening and normal prenatal karyotype. *J Med Gen* 2002; 39:75.

Yang CH, Chu Ho ES, Liu CC, et al. Prenatal diagnosis by amniocentesis before 15 weeks' gestation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*.1993; 52:81-6.

Yoon G, Chernos J, Sibbald B, Lo FJ, Hsieh WK. Association between congenital foot anomalies and gestational age at amniocentesis. *Prenat Diag* 2001; 21:1137-1141.

Young PE, Matson MR, Jones OW. Fetal exsanguinations and other vascular injuries from midtrimester genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 129:21-4.

Yuksel B, Greenoug A, Naik S, Cheeseman P, Nicolaidis KH. Perinatal lung function and invasive antenatal procedures. *Thorax* 1997; 52: 181-4.